

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

ISABELA SOARES MAGALHÃES

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM DA CASEÍNA DO
LEITE DE CABRA: EFEITOS NA CINÉTICA DE HIDRÓLISE, SOLUBILIDADE E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS HIDROLISADOS**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

ISABELA SOARES MAGALHÃES

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM DA CASEÍNA DO
LEITE DE CABRA: EFEITOS NA CINÉTICA DE HIDRÓLISE, SOLUBILIDADE E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS HIDROLISADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior

Coorientadores: Alline Artigiani Lima Tribst
Eduardo Basílio de Oliveira

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M189h
2022

Magalhães, Isabela Soares, 1995-
Hidrólise enzimática assistida por ultrassom da caseína do
leite de cabra: efeitos na cinética de hidrólise, solubilidade e
atividade antioxidante dos hidrolisados / Isabela Soares
Magalhães. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (52 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.280>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Leite de cabra - Proteínas. 2. Ultrassom. 3. Hidrólise.
I. Júnior, Bruno Ricardo de Castro Leite, 1989-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos.
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 637.1

ISABELA SOARES MAGALHÃES

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM DA CASEÍNA DO
LEITE DE CABRA: EFEITOS NA CINÉTICA DE HIDRÓLISE, SOLUBILIDADE E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS HIDROLISADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

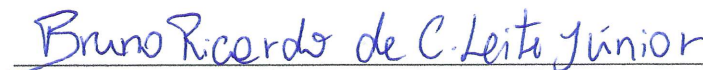
APROVADA: 25 de fevereiro de 2022

Assentimento:



Isabela Soares Magalhães

Autora



Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior

Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado até aqui e por abençoar grandemente o meu caminho.

Aos meus pais, Adriana e Pedro, por toda dedicação, amor, pelo apoio incondicional e por não medirem esforços para que eu realize os meus sonhos.

Às minhas irmãs, Yasmin e Júlia, por sempre estarem ao meu lado e serem minha fonte de alegria e companheirismo.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos em uma excelente instituição.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, professor Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior, por ser uma fonte de inspiração. Agradeço pelos ensinamentos, confiança, compreensão, incentivo e prontidão em ajudar em todos os momentos.

Aos meus coorientadores, Alline Artigiani Lima Tribst e professor Eduardo Basílio de Oliveira, que sempre estiveram dispostos a auxiliar no aperfeiçoamento do trabalho. Obrigada pela grande parceria.

Aos professores Maurílio Lopes Martins e Érica Nascif Rufino pela disponibilidade e contribuições tão importantes e necessárias.

Aos integrantes do LIPA, por serem ótimos colegas de trabalho, pela cooperação, conversas, cafezinhos e boas risadas.

Aos amigos que conheci durante essa caminhada, especialmente Ana Flávia, Alécia, Daniele, Larissa e Arthur. Obrigada pelos momentos compartilhados e viagens inesquecíveis.

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, fizeram parte dessa conquista e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

MAGALHÃES, Isabela Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Hidrólise enzimática assistida por ultrassom da caseína do leite de cabra: efeitos na cinética de hidrólise, solubilidade e atividade antioxidante dos hidrolisados.** Orientador: Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior. Coorientadores: Alline Artigiani Lima Tribst e Eduardo Basílio de Oliveira.

O leite de cabra é uma fonte de proteína com grande potencial de uso na obtenção de peptídeos bioativos e técnico-funcionais. Atualmente, a hidrólise enzimática é o principal método de obtenção desses peptídeos, porém possui como limitações o longo tempo de hidrólise, baixo rendimento e alto custo. Nesse contexto, o uso de tecnologias emergentes, como o ultrassom (US), têm sido uma estratégia que visa melhorar a performance enzimática e otimizar o processo de obtenção dos hidrolisados. Este estudo avaliou o efeito do ultrassom na hidrólise enzimática assistida da caseína do leite de cabra (CLC) e o impacto na solubilidade e atividade antioxidante dos hidrolisados obtidos. Três enzimas comerciais foram utilizadas: Alcalase, Brauzyn e Flavourzyme. A hidrólise assistida por ultrassom (40kHz; 23,8W/L) ocorreu por até 300 minutos, na temperatura ótima das enzimas (60°C) e pH 6,8. Os resultados demonstraram que o US aumentou a taxa de hidrólise em até 120%, bem como o grau de hidrólise (GH) máximo (23 - 48%) e a concentração de proteína solúvel em TCA (em até 40%) ($p < 0,05$). A solubilidade dos hidrolisados foi superior à da CLC nativa, com maior incremento em pH 4,0 (aumento de 5% para até 36,9%). Para a maioria das condições avaliadas, a hidrólise assistida por US aumentou a solubilidade dos hidrolisados da CLC em até 35,7% após 300 min de reação ($p < 0,05$). Além disso, principalmente para Alcalase, a tecnologia potencializou ($p < 0,05$) a atividade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados, que foram produzidos em menor tempo (redução de até 10 vezes), conforme os ensaios de ABTS ($p < 0,05$). Portanto, a utilização do banho ultrassônico durante a hidrólise enzimática da CLC é uma estratégia promissora a ser utilizada pela indústria alimentícia para potencializar a produção de hidrolisados com propriedades biológicas e técnico-funcionais.

Palavras-chave: Grau de hidrólise. Leite de cabra. Peptídeos. Propriedades biológicas. Propriedades técnico-funcionais. Proteínas. Sonicação.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Isabela Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein: effects on hydrolysis kinetics, solubility and antioxidant activity of hydrolysates.** Advisor: Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior. Co-advisors: Alline Artigiani Lima Tribst and Eduardo Basílio de Oliveira.

Goat milk is a protein source with great potential for use in obtaining bioactive and technical-functional peptides. Currently, enzymatic hydrolysis is the main method for obtaining these peptides, however it has limitations such as the long hydrolysis time, low yield, and high cost. In this context, the use of emerging technologies, such as ultrasound (US), has been a strategy that aims to improve enzymatic performance and optimize the process of obtaining hydrolysates. This study evaluated the effect of ultrasound on the enzymatic-assisted hydrolysis of goat milk casein (GMC) and the impact on the solubility and antioxidant activity of the hydrolysates obtained. Three commercial enzymes were used: Alcalase, Brauzyn and Flavourzyme. Ultrasound-assisted hydrolysis (40kHz; 23.8W/L) occurred for up to 300 minutes, at the optimum enzyme temperature (60°C) and pH 6.8. The results showed that US increased the hydrolysis rate by up to 120%, as well as the maximum degree of hydrolysis (DH) (23 - 48%) and TCA-soluble protein concentration (up to 40%) ($p < 0.05$). The solubility of hydrolysates was higher than that of native GMC, with higher increment at pH 4,0 (increase from 5% to up to 36.9%). For most of the conditions evaluated, US-assisted hydrolysis increased the solubility of GMC hydrolysates up to 35.7% after 300 min of reaction ($p < 0.05$). Furthermore, especially for Alcalase, the technology potentiated ($p < 0.05$) the *in vitro* antioxidant activity of the hydrolysates, which were produced in a shorter time (up to 10x reduction), according to ABTS assays ($p < 0.05$). Therefore, the use of ultrasonic bath during the enzymatic hydrolysis of GMC is a promising strategy to be used by the food industry to enhance the production of hydrolysates with biological and techno-functional properties.

Keywords: Hydrolysis degree. Goat milk. Peptides. Biological properties. Techno-functional properties. Protein. Sonication.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Principais proteínas do leite de cabra.....17

CAPÍTULO 2

Figure 1. Effect of temperature on the relative enzyme activity (REA) of Alcalase (A), Brauzyn (B), and Flavourzyme (C) on goat milk casein. Vertical bars represent the standard deviation. The temperature condition with the highest activity was established as optimal, with 100% of the enzyme activity. The relative enzyme activity (REA) was calculated using Eq. (1) for all other temperature values.....35

Figure 2. Increase in DH (%) (A, B, and C) and TCA soluble protein concentration (D, E, and F) of goat milk casein hydrolyzed at 60 °C assisted by ultrasound using different enzymes (A and D: Alcalase, B and E: Brauzyn, C and F: Flavourzyme) for 300 min. Dots are experimental data; continuous lines are the predicted data using Eq. (5). *Control means samples submitted to conventional hydrolysis.....36

Figure 3. Protein solubility (%) of goat milk casein from conventional and ultrasound-assisted hydrolysis at 60 °C using different enzymes (A: Alcalase, B: Brauzyn, C: Flavourzyme) for up to 300 min. Different letters at each pH indicate significant differences among samples ($p < 0.05$).....40

Figure 4. In vitro antioxidant activity from the DPPH (A) and ABTS (B) assays of goat milk casein during conventional and ultrasound-assisted hydrolysis at 60 °C using different enzymes for up to 300 min. Different letters for each enzyme indicate significant differences among processes ($p < 0.05$).....42

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Distribuição percentual das frações no conteúdo total de caseína do leite de cabra | 19 |
|---|----|

CAPÍTULO 2

| | |
|---|----|
| Table 1. Parameters of Eq. (2) adjusted to the curve of hydrolysis assisted by ultrasound at 60 °C of goat milk casein using different enzymes by DH (%) and by TCA soluble protein concentration..... | 37 |
|---|----|

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 10 |
| OBJETIVOS | 12 |
| Objetivo Geral | 12 |
| Objetivos Específicos | 12 |
| CAPÍTULO 1 | 13 |
| REFERENCIAL TEÓRICO..... | 13 |
| 1. Peptídeos com propriedades biológicas e técnico-funcionais..... | 13 |
| 2. Leite de cabra: características e potencial de uso na indústria alimentícia..... | 15 |
| 3. Hidrólise da caseína do leite de cabra (CLC) para obtenção de peptídeos bioativos e técnico-funcionais..... | 18 |
| 4. Utilização do ultrassom (US) para potencializar a hidrólise enzimática | 20 |
| 5. Referências..... | 22 |
| CAPÍTULO 2 | 26 |
| Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein: effects on hydrolysis kinetics and on the solubility and antioxidant activity of hydrolysates | 26 |
| Abstract..... | 27 |
| 1. Introduction | 28 |
| 2. Material and methods | 29 |
| 2.1 Enzymes and goat milk casein (GMC)..... | 29 |
| 2.2 Evaluation of enzyme activity in GMC at different temperatures..... | 30 |
| 2.3 US-assisted enzymatic hydrolysis of GMC..... | 31 |
| 2.3.1 Degree of hydrolysis..... | 31 |
| 2.3.2 TCA soluble protein concentration..... | 32 |
| 2.3.3 GMC hydrolysis kinetics | 32 |
| 2.4 Evaluation of solubility and <i>in vitro</i> antioxidant activity of hydrolysates obtained from ultrasound-assisted hydrolysis of GMC | 33 |
| 2.4.1. Solubility | 33 |
| 2.4.2. <i>In vitro</i> antioxidant activity | 33 |
| 2.5 Experimental design and statistical analysis | 34 |
| 3. Results and Discussion | 34 |
| 3.1 Enzyme activity in GMC at different temperatures | 34 |

| | |
|---|----|
| 3.2 US-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein..... | 35 |
| 3.3 Evaluation of protein solubility during ultrasound-assisted hydrolysis | 39 |
| 3.4 <i>In vitro</i> antioxidant activity of GMC during ultrasound-assisted hydrolysis | 41 |
| 4. Conclusions | 44 |
| Acknowledgments | 44 |
| 5. References..... | 45 |
| CONCLUSÕES GERAIS | 52 |

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, o impacto da alimentação na saúde dos indivíduos tem sido cada vez mais ressaltado, e com isso observa-se algumas tendências no consumo alimentar da população, como a busca por maior saudabilidade e maior diversificação da dieta. Um dos alimentos que tem despertado o interesse dos consumidores é o leite de cabra, visto que o setor caprino apresentou crescimento significativo no cenário mundial nos últimos anos, com tendência de aumento de aproximadamente 53% até 2030 (PULINA et al., 2018).

O leite de cabra é um fluido biológico complexo que possui proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e minerais em sua composição (PARK, 2017). Parte da produção destina-se à fabricação de derivados lácteos como queijos, cremes e iogurtes, o que contribui para a agregação de valor à matéria-prima e evidencia sua versatilidade. Além destes produtos, é possível diversificar a aplicação desta matéria prima através da produção de peptídeos com propriedades biológicas e técnico-funcionais a partir das proteínas do leite caprino.

As propriedades de um peptídeo variam de acordo com sua composição e sequência de aminoácidos. Em geral, podem apresentar importantes propriedades técnico-funcionais, como atividade emulsificante, formação de gel e espuma e retenção de água e óleo, sendo importante que possuam alta solubilidade. Além disso, podem apresentar propriedades biológicas como atividade antioxidante, anti-hipertensiva, imunomoduladora, antidiabética, antimicrobiana, dentre outras, sendo nesse caso, chamados de peptídeos bioativos (KARAMI; AKBARI-ADERGANI, 2019).

Estudos sobre as propriedades técnico-funcionais das proteínas do leite caprino, em especial as caseínas e seus hidrolisados, ainda são escassos. Por outro lado, alguns trabalhos já detectaram a presença de peptídeos bioativos, com atividade antioxidante e anti-hipertensiva, obtidos da hidrólise das proteínas do leite de cabra (LI et al, 2013; IBRAHIM; AHMED; MIYATA, 2017).

Dentre os métodos de obtenção desses peptídeos, destaca-se a hidrólise enzimática devido às vantagens que possui, principalmente a alta especificidade. No entanto, esse processo tem algumas limitações como o alto custo das enzimas e baixo rendimento, e por isso tem-se associado esse método ao uso de tecnologias, como por exemplo o ultrassom (US), com o objetivo de melhorar a performance enzimática (ULUG; JAHANDIDEH; WU, 2020).

O US é considerado uma tecnologia ambientalmente segura, e seu uso na indústria alimentícia é promissor, visto que não está associado à geração de compostos tóxicos e

promove menos danos nutricionais e sensoriais nos alimentos quando comparado ao processamento térmico. Atualmente, existe uma ampla oferta de equipamentos disponíveis no mercado, incluindo banhos ultrassônicos, que podem apresentar ótimo custo-benefício quando comparados ao US de sonda, devido ao menor custo do equipamento, maior resistência por atuar em condições mais brandas e maior potencial de escalabilidade (SOARES et al., 2019; OLIVEIRA, et al., 2020; SOARES et al., 2020). No entanto, os efeitos da hidrólise enzimática assistida por US da caseína do leite cabra (CLC) na obtenção de peptídeos bioativos e técnico-funcionais, ainda não foram estudados. Portanto, diante do exposto, nota-se que há uma lacuna no conhecimento técnico-científico a ser preenchida, visando potencializar a hidrólise enzimática da CLC e, conseqüentemente, a obtenção de peptídeos com propriedades biológicas e técnico-funcionais.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito do ultrassom (US) na hidrólise enzimática assistida da caseína do leite de cabra (CLC) e o impacto na solubilidade e atividade antioxidante dos hidrolisados obtidos.

Objetivos Específicos

- Determinar a temperatura ótima de atividade das proteases Alcalase, Brauzyn e Flavourzyme.
- Avaliar o efeito da reação enzimática assistida por US na taxa e no grau de hidrólise (GH) da CLC ao longo de 300 minutos.
- Avaliar o efeito da hidrólise enzimática assistida por US da CLC na porcentagem de proteínas solúveis em TCA ao longo de 300 minutos.
- Avaliar o impacto da hidrólise enzimática assistida por US da CLC em diferentes tempos (30, 120 e 300 min) na solubilidade dos hidrolisados obtidos.
- Avaliar *in vitro* o impacto da hidrólise enzimática assistida por US da CLC em diferentes tempos (30, 120 e 300 min) na propriedade antioxidante dos hidrolisados.

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Peptídeos com propriedades biológicas e técnico-funcionais

Os peptídeos são fragmentos proteicos formados por dois ou mais resíduos de aminoácidos, e dependendo de sua composição, podem apresentar propriedades biológicas e técnico-funcionais. Em termos de funcionalidade, a capacidade de formação de espuma, de retenção de água e óleo, propriedades emulsificantes e solubilidade são conhecidas por desempenharem um papel importante no processamento de alimentos e desenvolvimento de novos produtos alimentícios (SHOKRI et al., 2022).

Já os peptídeos bioativos normalmente possuem entre 2 e 20 resíduos de aminoácidos e podem desempenhar alguma atividade biológica. Estudos têm demonstrado que esses compostos podem se ligar a receptores de células ou inibir enzimas envolvidas em processos metabólicos específicos e assim exercerem importantes atividades, tais como antioxidante, anti-hipertensiva, imunomoduladora, antidiabética, entre outras. Em função disso, aumentou-se o interesse a respeito da obtenção e aplicabilidade desses peptídeos como ingredientes alimentares nutracêuticos (MONTESANO et al., 2020; KARAMI; AKBARI-ADERGANI, 2019).

A origem desses compostos são as diferentes fontes de proteínas, como carnes, ovos, leite, vegetais folhosos, cereais, leguminosas e até mesmo insetos (MONTESANO et al., 2020). Para que os peptídeos desempenhem suas propriedades, os mesmos devem ser hidrolisados, pois se encontram inativos na proteína original. As formas de obtenção são basicamente a hidrólise enzimática e química, sendo a hidrólise enzimática mais utilizada, pois, apesar do alto custo das enzimas, possui vantagens como a alta especificidade e a não formação de compostos tóxicos (ULUG, JAHANDIDEH, WU, 2020). Diversos fatores podem afetar diretamente a funcionalidade de peptídeos bioativos e técnico-funcionais, como o peso molecular, a sequência e composição de aminoácidos, as condições de processamento e a fonte de proteína utilizada (CASTRO; SATO, 2015).

Algumas propriedades biológicas já foram relatadas em estudos com diferentes matérias-primas, como por exemplo a atividade antidiabética, detectada em hidrolisados de leite de camelo, coprodutos de salmão e até mesmo insetos (MUDGIL et al., 2018; HARNEDY et al., 2018; RIVERO-PINO et al., 2020). Peptídeos anti-hipertensivos também têm sido muito estudados e já foram identificados em pesquisas com proteínas da soja, farelo de arroz, pele

de tilápia e queijo de cabra (WANG et al., 2017; KOCAK et al., 2020; CHEN et al., 2021; XU et al., 2021).

Dentre as fontes proteicas de origem vegetal destacam-se os cereais e leguminosas, que são ricos nesse nutriente e possuem característica complementar no perfil de aminoácidos. As propriedades antioxidante e anti-hipertensiva foram relatadas em estudos recentes envolvendo as proteínas do gérmen de trigo e do feijão (KARAMI et al., 2019; XIE et al., 2019), bem como as atividades emulsificante e espumante em estudos com os isolados proteicos de ervilha e soja, respectivamente (XIONG et al., 2018; MORALES et al., 2015).

Em relação às fontes de proteínas de origem animal, o leite é uma opção bastante explorada, principalmente o leite bovino. Diferentes trabalhos já avaliaram as propriedades das proteínas lácteas ou de seus hidrolisados e identificaram atividades antioxidantes, anti-hipertensivas e imunomoduladoras, além de propriedades técnico-funcionais como emulsificantes, estabilização de espuma e solubilidade (MULEY et al., 2020; WU et al., 2018; SHEN; SHAO; GU, 2016).

A solubilidade é considerada uma propriedade essencial, pois pode impactar diretamente no desempenho de outras atividades biológicas e técnico-funcionais (OMURA et al., 2021). Em geral, a solubilidade está relacionada ao tamanho da partícula de proteína, ou seja, uma partícula menor tem maior contato em sua área de superfície, o que aumenta a propensão à solubilidade, e conseqüentemente, otimiza atividades como a capacidade de formação de espuma e emulsão (SHOKRI et al., 2022).

Logo, o nível de solubilidade proteica pode aumentar após a hidrólise enzimática devido à redução no peso molecular do substrato e conseqüentemente ao aumento de unidades polipeptídicas menores e mais hidrofílicas (KILARA; PANYAM, 2003). O tipo de enzima e o tempo de reação podem influenciar na solubilidade final dos hidrolisados (LUO; PAN; ZHONG, 2014), sendo importante otimizar as condições de processamento para obtenção de compostos mais solúveis.

Em relação às propriedades biológicas, a atividade antioxidante tem sido alvo de atenção, pois está relacionada à prevenção de doenças crônicas e fenômenos de envelhecimento, que podem ser causados pelo excesso de radicais livres no corpo. Essa propriedade pode ser avaliada por diferentes mecanismos, como poder redutor, atividade sequestrante do radical hidroxila e eliminação de radicais livres (CUI et al., 2022)

Os radicais livres são altamente reativos, pois contêm número ímpar de elétrons em sua última camada. Em ensaios *in vitro* para avaliação da capacidade antioxidante de hidrolisados proteicos, os radicais DPPH (2,2-diphenyl- 1-picrylhydrazyl) e ABTS (2,2'-azino-bis (ácido

3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) são comumente utilizados (LI et al., 2013; MULEY et al., 2021; ZHONG et al., 2021).

A atividade antioxidante de proteínas pode ser limitada pela estrutura terciária de polipeptídeos, uma vez que muitos aminoácidos com potencial antioxidante podem estar localizados dentro do núcleo proteico, onde são inacessíveis. Como exemplo, tem-se a estrutura da β -lactoglobulina nativa, na qual a maioria dos aminoácidos com capacidade de eliminação de radicais livres está localizada no interior da estrutura proteica, não contribuindo com a atividade antioxidante da proteína intacta. Nesse contexto, tem-se como uma das estratégias a hidrólise enzimática, que pode causar a ruptura da estrutura terciária e aumentar o contato entre os resíduos de aminoácidos e o meio (ELIAS; KELLERBY; DECKER., 2008). Diferentes estudos relataram o aumento da atividade antioxidante de proteínas após a hidrólise (CASTRO; SATO, 2015; CUI et al., 2022).

Um estudo feito com as proteínas do leite de cabra demonstrou que, tanto os hidrolisados obtidos da caseína quanto das proteínas do soro, possuíram capacidade de eliminação do radical DPPH e do ânion superóxido (AHMED et al., 2015). Diante do exposto, nota-se a relevância da busca por hidrolisados com propriedades biológicas e técnico-funcionais a partir de diferentes fontes proteicas. Assim, são promissores os estudos com alimentos pouco explorados e produzidos em menor escala, como o leite de cabra, pois possuem alto potencial de crescimento no mercado e, em paralelo, revelam-se uma alternativa de renda para diversas comunidades rurais.

2. Leite de cabra: características e potencial de uso na indústria alimentícia

A produção mundial de leite é liderada pelo leite bovino, representando mais de 80% da produção total nos últimos anos. No entanto, a produção de leite proveniente de outros animais tem aumentado, como o de búfalas, ovelhas e cabras. Nos últimos 50 anos, a produção mundial de leite caprino mais que dobrou e espera-se um aumento de aproximadamente 53% até 2030 (PULINA et al., 2018). No Brasil, a produção se destaca na região Nordeste, mas pode-se observar crescimento do setor nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (SILVA; FAVARIN, 2020).

Do ponto de vista da legislação, o leite de cabra é definido pela Instrução Normativa nº 37 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como “o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina, sadios, bem alimentados e descansados” (BRASIL, 2000). Estima-se que essa

matéria-prima represente 2% do suprimento anual de leite do mundo. Os pequenos ruminantes leiteiros estão localizados principalmente em áreas temperadas subtropicais de continentes como a Ásia, África e Europa. As cabras leiteiras estão presentes tanto em países de baixa renda e com população sujeita a déficit alimentar, quanto em países de alta renda e tecnologicamente desenvolvidos (PULINA et al., 2018).

No Brasil, a produção de leite de cabra tem contribuição significativa da região Nordeste, sendo o estado da Paraíba o maior produtor do país. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), recentemente o rebanho caprino apresentou crescimento de 16%, totalizando mais de 8 milhões de cabeças, o que demonstra seu potencial no contexto do agronegócio brasileiro. Além do leite fluido, que em sua maioria é direcionado para programas de distribuição de alimentos no Nordeste, também são comercializados os seus derivados, produzidos principalmente na região Sudeste, como o leite em pó, iogurte, queijos e doces (SILVA; FAVARIN, 2020; DUARTE; OCCULATI; MANFRÉ, 2019; IBGE, 2017).

Em relação à composição nutricional, o leite caprino contém aproximadamente 12,2% de sólidos totais, sendo 3,8% de gordura, 3,4% de proteína, 4,1% de lactose e 0,8% de cinzas, podendo variar de acordo com a dieta do animal, raça, número de partos, estágio de lactação, condições ambientais, estação do ano e condições de manejo (PARK, 2017). O conteúdo de vitaminas e minerais do leite de cabra é amplo, possuindo níveis satisfatórios de vitamina A e vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina e niacina), além de minerais como cálcio, zinco, selênio, manganês e cobre (LIMA et al., 2016).

O sabor e o odor característicos do leite caprino estão diretamente relacionados ao seu perfil lipídico, em especial à presença dos ácidos capróico, caprílico e cáprico. No que diz respeito ao tamanho médio dos glóbulos de gordura, o leite de cabra apresenta menores diâmetros quando comparado aos leites de vaca e humano, o que por sua vez confere melhor dispersão e contribui para a formação de uma mistura mais homogênea. Essa maior dispersão pode facilitar a digestibilidade do leite, pois fornece maior área de superfície para ação das lipases (PARK, 2017).

Um estudo foi realizado para avaliar a digestão gástrica de fórmulas infantis feitas com leite de cabra e leite de vaca, por meio de um simulador dinâmico *in vitro*, e observou-se que as fórmulas de leite de cabra formavam agregados menores de proteína e gotículas menores de gordura em condições gástricas, levando a uma digestão mais rápida quando comparadas às fórmulas de leite de vaca. O resultado foi associado ao perfil proteico das fórmulas, sugerindo que a composição das micelas de caseína do leite caprino pode desempenhar um papel importante na digestibilidade do alimento (YE et al., 2019).

As principais proteínas do leite de cabra estão divididas entre caseínas (β -caseína, κ -caseína, α_{s1} -caseína e α_{s2} -caseína) e proteínas do soro (β -lactoglobulina, α -lactalbumina, soro albumina, imunoglobulinas e lactoferrina) (Figura 1).

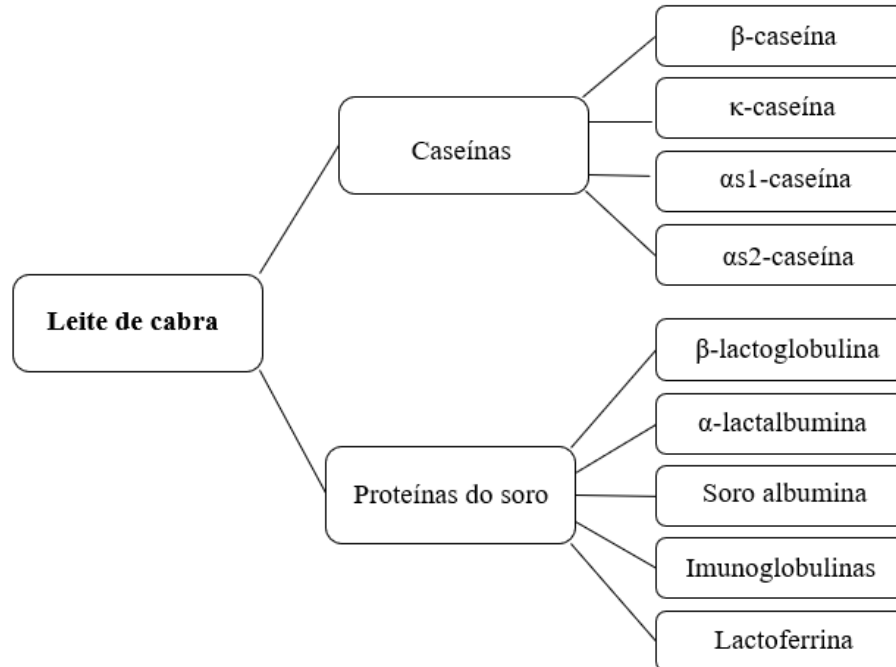


Figura 1 – Principais proteínas do leite de cabra. Fonte: Autoria própria.

As proteínas do soro representam cerca de 15-25% da concentração da proteína total do leite de cabra. Já as caseínas contribuem de forma predominante com percentual que varia de 60-80%. O conteúdo total de caseína do leite caprino é inferior ao do leite bovino e as frações β -caseína e α_{s1} -caseína são as mais abundantes no leite de cabra e vaca, respectivamente (PARK, 2017). Há estudos que relacionam o potencial alergênico do leite à presença da fração α_{s1} -caseína e, por isso, o leite caprino é considerado hipoalergênico quando comparado ao leite bovino (DELGADO-JÚNIOR; SIQUEIRA; STOCK, 2020).

As micelas de caseína caprina são menos estáveis ao calor e se desnaturam mais rapidamente do que as micelas de caseína bovina, porém contêm mais cálcio e fósforo inorgânico, além de apresentarem níveis de mineralização superiores (PARK et al., 2007). Em relação ao perfil de aminoácidos, as α -caseína (tanto α_{s1} como α_{s2} -caseína) contêm mais aspartato, lisina e tirosina do que as β -caseína, que por sua vez possuem mais leucina, prolina e valina. O conteúdo total de aminoácidos no leite de cabra é superior ao do leite humano, mas são semelhantes aos leites de diversas espécies quanto à presença de aminoácidos essenciais (representando 40% do total de aminoácidos), aminoácidos de cadeia ramificada (20%) e aminoácidos sulfurados (4%) (PARK, 2017).

Sabe-se que as proteínas do leite bovino são amplamente utilizadas na indústria alimentícia para fins de retenção de água, formação de espuma e emulsificação. Além disso, são usadas como ingrediente em diversos produtos como massas, sorvetes e bolos (SHOKRI et al., 2022). O leite de cabra também possui propriedades funcionais, que podem ser afetadas por sua composição proteica e pelo polimorfismo genético de suas proteínas, o que está associado a parâmetros quantitativos e qualitativos do leite (ALBENZIO; SANTILLO, 2011).

Do ponto de vista nutricional, o leite de cabra é muito semelhante ao leite de origem bovina, especialmente no conteúdo percentual de proteínas (3,4 e 3,2% respectivamente). Além disso, possuem características físico-químicas muito parecidas como a densidade, índice de refração, e a viscosidade que é ligeiramente inferior para o leite caprino (PARK et al., 2017). Logo, essa matéria-prima possui grande potencial de utilização na indústria alimentícia, visto que, além de possuir aspectos nutricionais favoráveis, seu setor tem apresentado um crescimento substancial, com excelentes perspectivas para os próximos anos (PULINA et al., 2018).

Além disso, propriedades biológicas foram identificadas a partir das proteínas do leite de cabra, como peptídeos anti-hipertensivos, sendo derivados da β -lactoglobulina, β -caseína e κ -caseína. Esses hidrolisados apresentaram atividade comparável à de um fármaco anti-hipertensivo, o que demonstra o cenário positivo na introdução desses compostos naturais no mercado farmacêutico e alimentício (IBRAHIM; AHMED; MIYATA, 2017).

Dentre as proteínas do leite de cabra, Espejo-Carpio et al. (2013) destacam o potencial de utilização das caseínas. Os autores compararam a atividade anti-hipertensiva de hidrolisados obtidos de frações de caseína do leite de cabra e proteínas do soro. A maior capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi obtida a partir da fração de caseína hidrolisada, que originou uma série de peptídeos ainda não identificados com semelhança estrutural com outros peptídeos inibidores de ECA já conhecidos (ESPEJO-CARPIO et al., 2013). Esses resultados, somados à predominância da caseína dentre as proteínas do leite de cabra, evidenciam o grande potencial de utilização dessa fração na produção de peptídeos com propriedades biológicas e técnico-funcionais.

3. Hidrólise da caseína do leite de cabra (CLC) para obtenção de peptídeos bioativos e técnico-funcionais

A composição das caseínas do leite de cabra é influenciada pelo polimorfismo genético nos loci da caseína, que são posições específicas em um cromossomo onde estão localizados determinados genes (PARK et al., 2017). Dentre as diferentes frações, a β -caseína é a mais

abundante, representando aproximadamente 55% do conteúdo total de caseínas, seguida pela κ -caseína, α_{s2} -caseína e α_{s1} -caseína (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição percentual das frações no conteúdo total de caseína do leite de cabra

| Fração de caseína | % do total de caseína |
|------------------------|-----------------------|
| β -caseína | 54,8 |
| κ -caseína | 20,4 |
| α_{s2} -caseína | 19,2 |
| α_{s1} -caseína | 5,6 |
| Total | 100 |

Fonte: Adaptada de PARK et al., 2017

O polimorfismo da caseína parece estar associado a diferentes níveis de síntese dessa proteína e diferentes taxas de fosforilação da cadeia peptídica e, somado à composição, pode ser responsável pela geração do amplo espectro de peptídeos derivados da caseína. Esses peptídeos se encontram inativos na proteína precursora e podem ser liberados pela ação de proteases adicionadas ou que estejam naturalmente presentes no leite (ALBENZIO; SANTILLO, 2011).

Nesse contexto, a hidrólise da CLC tem sido estudada em relação a seu potencial na geração de peptídeos com propriedades biológicas. A proteína intacta normalmente apresenta atividade biológica inferior a seus hidrolisados, como demonstrado por um estudo feito com a caseína e os peptídeos obtidos após hidrólise pela pepsina gástrica. Ao serem avaliados, os hidrolisados exibiram atividade de inibição de ECA significativamente maior que a caseína, com destaque para os peptídeos hidrofóbicos que se mostraram os inibidores mais potentes (IBRAHIM; AHMED; MIYATA, 2017).

Um estudo *in vitro* foi realizado para avaliar a propriedade antidiabética de hidrolisados da caseína do leite de cabra e observou-se que os peptídeos obtidos após 3 horas de hidrólise aumentaram significativamente a taxa de consumo de glicose em células resistentes à insulina. Os peptídeos bioativos identificados eram derivados das frações β -caseína, α_{s1} -caseína e α_{s2} -caseína (GONG et al., 2020).

Li et al. (2013) utilizaram uma combinação de proteases neutras e alcalinas para a obtenção dos hidrolisados da CLC. Após purificação e identificação dos peptídeos, comparou-se a atividade antioxidante entre esses hidrolisados e a caseína. A eliminação de radicais livres e a capacidade quelante de íons metálicos foram significativamente maiores após a hidrólise. A alta atividade antioxidante dos hidrolisados, que aumentou em até 380 vezes, foi atribuída

especialmente a alguns oligopeptídeos que foram observados pela primeira vez em hidrolisados da CLC, revelando a necessidade de mais estudos a respeito dessa propriedade utilizando a CLC como substrato da hidrólise.

Em relação às propriedades técnico-funcionais da CLC e seus hidrolisados, os estudos ainda são escassos, o que demonstra a relevância de se ampliar a investigação do potencial da CLC na geração de peptídeos com tais propriedades, em especial a de solubilidade, que está diretamente relacionada ao desempenho das demais.

4. Utilização do ultrassom (US) para potencializar a hidrólise enzimática

O ultrassom (US) é uma tecnologia que se baseia na propagação de ondas mecânicas com frequência superior ao limite audível humano de 20kHz, denominadas ondas ultrassônicas. É uma tecnologia não térmica e considerada ecologicamente correta, que vem sendo utilizada na produção de peptídeos bioativos em combinação com o método enzimático. Seu principal mecanismo de ação é o processo de cavitação acústica, caracterizada pela formação, expansão e implosão de microbolhas no meio, o que pode gerar modificações físicas e químicas nos compostos submetidos a esse processamento (BRENNEN, 2013; ULUG, JAHANDIDEH, WU, 2020).

O US pode ser aplicado estrategicamente para melhorar a hidrólise enzimática, que atualmente é o principal meio de obtenção dos peptídeos. Muitos trabalhos têm avaliado o efeito do US como pré-tratamento do substrato, visando alterações estruturais nas proteínas que as tornem mais acessíveis à hidrólise (ULUG, JAHANDIDEH, WU, 2020). Além disso, o US pode ser utilizado no pré-tratamento das enzimas, promovendo ativação e estabilização, bem como durante a reação enzimática, no qual pode ocorrer um aumento na transferência de energia e massa, e conseqüentemente aceleração da reação (SOARES et al., 2019).

Nos últimos anos, as pesquisas têm demonstrado que o uso do ultrassom pode influenciar nas propriedades técnico-funcionais das proteínas através da modificação de sua estrutura molecular. Um estudo de revisão avaliou o impacto do US em diferentes atividades técnico-funcionais das proteínas do leite, como capacidade emulsificante, formação de espuma, de gel, capacidade de retenção de água e solubilidade. Concluiu-se que os efeitos de melhoria do US em cada uma das propriedades foram dependentes das condições de utilização do US e do tipo de proteína tratada (SHOKRI et al., 2022).

Outro estudo avaliou o efeito do ultrassom de alta intensidade nas propriedades técnico-funcionais das proteínas do soro do leite. Como resultado, observou-se que a solubilidade das

proteínas e a hidrofobicidade de superfície foram aumentados por tratamento ultrassônico, que também resultou em mudanças significativas na viscosidade aparente das soluções proteicas. Além disso, os índices de atividade da emulsão e de estabilidade da emulsão foram aumentados pelo tratamento com US, demonstrando que essa tecnologia pode ser usada para melhorar certas propriedades técnico-funcionais das proteínas do soro do leite (SHEN; SHAO; GU, 2016).

A tecnologia tem sido avaliada na geração de peptídeos derivados de diferentes proteínas alimentares, desde fontes mais conhecidas como o leite, até outras inovadoras, como os insetos. Esses últimos foram estudados por Rivero-Pino et al. (2020), que avaliaram o efeito do pré-tratamento ultrassônico (20 kHz, 500 W, 15 e 30 min) nas proteínas de *Tenebrio molitor*, visando a produção de peptídeos antidiabéticos. Foi possível observar que comparado ao tratamento controle, o uso do ultrassom otimizou a obtenção de peptídeos altamente bioativos em pouco tempo de hidrólise. Além disso, o curto período de exposição das proteínas ao pré-processamento por US foi mais benéfico que o período mais longo (15 e 30 min, respectivamente), ressaltando a importância da otimização das condições de pré-processamento na obtenção dos resultados de interesse. Segundo os autores, nesse caso, o tempo adicional pode ter favorecido a formação de agregados proteicos, dificultando o acesso enzimático.

Wu et al. (2018) avaliaram a atividade inibitória de ECA e propriedade imunomoduladora de peptídeos obtidos da hidrólise enzimática de proteínas do soro do leite submetidas ao pré-tratamento ultrassônico (20 kHz, 300 W, 15 min). Os resultados demonstraram que o processo causou modificações estruturais nas proteínas, induzindo o desdobramento das moléculas e aumentando a hidrofobicidade superficial, o que pode favorecer a reação de hidrólise por melhorar o acesso enzimático às proteínas. Como resultado, o grau de hidrólise e as atividades biológicas avaliadas foram superiores para o grupo exposto ao US, quando comparado ao tratamento controle.

Já no estudo de Koirala, Prathumpai e Anal (2021), a atividade antioxidante e a capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina foram avaliadas após o pré-tratamento ultrassônico (24 kHz, 200 W e 20 minutos) de proteínas do leite caprino seguido de hidrólise enzimática. Observou-se que o pré-tratamento aumentou a concentração de proteínas solúveis no leite e conseqüentemente a obtenção de peptídeos foi superior. Os hidrolisados se mostraram bioativos para as duas propriedades e, segundo os autores, isso se deve à sequência única de aminoácidos de baixo peso molecular, estrutura e condições de

extração, indicando uma contribuição positiva da tecnologia de ultrassom ao potencializar a geração desses peptídeos (KOIRALA; PRATHUMPAI; ANAL, 2021).

Apesar da existência de estudos com as proteínas do leite de cabra submetidas ao pré-tratamento ultrassônico e seu efeito nas propriedades biológicas dos peptídeos obtidos, não há trabalhos científicos que descrevam o efeito do uso do banho ultrassônico durante a hidrólise enzimática de caseína do leite de cabra (CLC). Além disso, outras variáveis pouco exploradas como tempo de reação, temperatura, pH, potência do US, e protease utilizada na hidrólise são importantes e podem influenciar os resultados.

Logo, o aumento na transferência de energia e massa, e redução da temperatura e tempo de hidrólise devem ser estudados de forma ampla, pois podem viabilizar a aplicação desta tecnologia na produção de peptídeos bioativos e técnico-funcionais. Considerando que o uso do US na geração de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática da CLC ainda não foi explorado em sua totalidade, fica claro que há uma lacuna no conhecimento técnico-científico a ser preenchida.

5. Referências

- AHMED, A. S. et al. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, v. 74, p. 80-88, 2015.
- ALBENZIO, M; SANTILLO, A. Biochemical characteristics of ewe and goat milk: Effect on the quality of dairy products. **Small Ruminant Research**, v. 101, n. 1-3, p. 33-40, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução normativa nº 37, 31 de outubro 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra.
- BRENNEN, Christopher E. **Cavitation and bubble dynamics**. Cambridge university press, 2014.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidant activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 55-62, 2015.
- CHEN, J. et al. Proteolysis of tilapia skin collagen: Identification and release behavior of ACE-inhibitory peptides. **LWT-Food Science and Technology**, v. 139, p. 110502, 2021.
- CUI, Q. et al. Effect of two-step enzymatic hydrolysis on the antioxidant properties and proteomics of hydrolysates of milk protein concentrate. **Food Chemistry**, v. 366, p. 130711, 2022.
- DELGADO-JÚNIOR, I. J.; SIQUEIRA, K. B.; STOCK, L. A. Produção, composição e

processamento de leite de cabra no Brasil. **Embrapa Gado de Leite – Circular Técnica**, Juiz de Fora, 2020.

DUARTE, L. B.; OCCULATI, R. M.; MANFRÉ, E. R. Comercialização de leite e derivados de leite de cabra no Brasil. **Anais Sintagro**, v. 11, n. 1, 2019.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430-441, 2008.

ESPEJO-CARPIO, F. J. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. **International Dairy Journal**, v. 32, n. 2, p. 175-183, 2013.

GONG, H. et al. Identification of novel peptides from goat milk casein that ameliorate high-glucose-induced insulin resistance in HepG2 cells. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 6, p. 4907-4918, 2020.

HARNEDY, P. A. et al. Atlantic salmon (*Salmo salar*) co-product-derived protein hydrolysates: A source of antidiabetic peptides. **Food research international**, v. 106, p. 598-606, 2018.

IBRAHIM, H. R.; AHMED, A. S.; MIYATA, T. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. **Journal of advanced research**, v. 8, n. 1, p. 63-71, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Censo Agropecuário. 2017.

KARAMI, Z.; AKBARI-ADERGANI, B. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 535 – 547, 2019.

KARAMI, Z. et al. Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates. **Food Bioscience**, v. 32, p. 100450, 2019.

KILARA, Arun; PANYAM, Dinakar. Peptides from milk proteins and their properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 6, p. 607-633, 2003.

KOCAK, A. et al. Role of using adjunct cultures in release of bioactive peptides in white-brined goat-milk cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v. 123, p. 109127, 2020.

KOIRALA, S; PRATHUMPAI, W; ANAL, A. K. Effect of ultrasonication pretreatment followed by enzymatic hydrolysis of caprine milk proteins and on antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of peptides thus produced. **International Dairy Journal**, v. 118, p. 105026, 2021.

- LIMA, I. S. S. et al. Fat protected and profile of fatty acids goat milk: a review. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 4, p. 830-840, 2016.
- LI, Z. et al. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4242-4251, 2013.
- LUO, Y.; PAN, K.; ZHONG, Q. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: partial characterizations. **Food chemistry**, v. 155, p. 146-154, 2014.
- MONTESANO, D. et al. Biopeptides from vegetable proteins: new scientific evidences. **Current Opinion in Food Science**, v. 31, p. 31-37, 2020.
- MORALES, R. et al. Modification of foaming properties of soy protein isolate by high ultrasound intensity: Particle size effect. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 26, p. 48–55, 2015.
- MUDGIL, P. et al. Characterization and identification of novel antidiabetic and anti-obesity peptides from camel milk protein hydrolysates. **Food chemistry**, v. 259, p. 46-54, 2018.
- MULEY, A. B. et al. Production of biologically active peptides by hydrolysis of whey protein isolates using hydrodynamic cavitation. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 71, p. 105385, 2021.
- OLIVEIRA, A. P. H. et al. Combined adjustment of pH and ultrasound treatments modify techno-functionalities of pea protein concentrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 603, p. 125156, 2020.
- OMURA, Michele Harumi et al. Effects of protein concentration during ultrasonic processing on physicochemical properties and techno-functionality of plant food proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 106457, 2021.
- PARK, Y. W. et al. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small ruminant research**, v. 68, n. 1-2, p. 88-113, 2007.
- PARK, Y. W. Goat milk–chemistry and nutrition. **Handbook of milk of non-bovine mammals**, p. 42-83, 2017.
- PULINA, G. et al. Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 6715-6729, 2018.
- RIVERO-PINO, F. et al. Effect of ultrasound pretreatment and sequential hydrolysis on the production of *Tenebrio molitor* antidiabetic peptides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 123, p. 217-224, 2020.
- SHEN, X.; SHAO, S.; GUO, M. Ultrasound-induced changes in physical and functional properties of whey proteins. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 2, p. 381-388, 2017.

- SHOKRI, S. et al. Effects of ultrasound on the techno-functional properties of milk proteins: A systematic review. **Ultrasonics Sonochemistry**, p. 105938, 2022.
- SILVA, H. W.; FAVARIN, S. A importância econômica da criação de cabra leiteira para o desenvolvimento rural. **Revista Científica Rural**, v. 22, n. 1, p. 46-53, 2020.
- SOARES, A. D. S. et al. Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate and assisted reaction. **LWT-Food Science and Technology**, v. 130, p. 109636, 2020.
- SOARES, A.D.S. et al. Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase: Investigation on substrate, enzyme and kinetics parameters. **LWT-Food Science and Technology**, v. 107, p. 164-170, 2019.
- ULUG, S. K.; JAHANDIDEH, F.; WU, J. Novel technologies for the production of bioactive peptides. **Trends in Food Science & Technology**, 2020.
- WANG, X. et al. A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: Biochemical characterization and molecular docking study. **LWT-Food Science and Technology**, v. 75, p. 93-99, 2017.
- WU, Q. et al. Effect of ultrasonic pretreatment on whey protein hydrolysis by alcalase: Thermodynamic parameters, physicochemical properties and bioactivities. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 46-54, 2018.
- XIONG, Ting et al. Identification and quantification of proteins at adsorption layer of emulsion stabilized by pea protein isolates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 1-9, 2018.
- XU, Z. et al. Identification of post-digestion angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean protein Isolate: Their production conditions and in silico molecular docking with ACE. **Food Chemistry**, v. 345, p. 128855, 2021.
- YE, A. et al. Dynamic in vitro gastric digestion of infant formulae made with goat milk and cow milk: Influence of protein composition. **International dairy journal**, v. 97, p. 76-85, 2019.
- ZHONG, Weigang et al. Digestibility of polymerized whey protein using in vitro digestion model and antioxidative property of its hydrolysate. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101109, 2021.

CAPÍTULO 2

Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein: effects on hydrolysis kinetics and on the solubility and antioxidant activity of hydrolysates

Trabalho publicado na revista Food Research International. Magalhães, I. S.; Guimarães, A. D. B.; Tribst, A. A. L.; Oliveira, E. B.; Leite Júnior, B. R. C. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein: effects on hydrolysis kinetics and on the solubility and antioxidant activity of hydrolysates. **Food Research International**, v. 157, p. 111310, 2022.

CAPÍTULO 2

Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein: effects on hydrolysis kinetics and on the solubility and antioxidant activity of hydrolysates

Abstract

This study evaluated the ability of ultrasound (US) bath to improve the hydrolysis of goat milk casein (GMC) by three commercial proteases (Alcalase, Brauzyne and Flavourzyme) using assisted reactions at 60 °C for up to 300 min. Process performance was evaluated based on the rate reaction, final hydrolysis degree, solubility, and antioxidant activity of the hydrolysates. For all enzymes, the US-assisted reaction increased the rate of GMC hydrolysis (up to 120%), the hydrolysis degree (23–48%), and the small peptides formed, i.e., those soluble in trichloroacetic acid (TCA) (up to 40%). Consequently, US-assisted GMC hydrolysis improved the solubility of the hydrolyzed product (up to a 35.7% increase after 300 min of reaction) and, compared to conventional hydrolysis, reduced the time to achieve the maximum solubility by up to 10 times. Regarding the *in vitro* antioxidant activity, especially for Alcalase, the technology promoted a higher scavenging capacity of 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ($p < 0.05$), thus 10-fold accelerating the production of antioxidant peptides, according to ABTS assays ($p < 0.05$). In conclusion, the US-assisted enzymatic reaction is a promising technology to improve the hydrolysis rate and yield of the process of obtaining hydrolysates from GMC. Moreover, these hydrolysates showed high solubility and good *in vitro* antioxidant activity, which demonstrates the potential to be used as food ingredient with nutritional and techno-functional appeal.

Keywords: Biological properties; Goat milk protein; Hydrolysis degree; Peptides; Proteases; Protein solubility; Techno-functional properties; Ultrasounds.

1. Introduction

Goat milk has a high nutritional value due to its composition. Worldwide, its production has grown in recent years, and there is an expectation to increase by approximately 53% until 2030 (Pulina et al., 2018; Silva & Favarin, 2020).

The main proteins in goat milk are divided between caseins and whey proteins, with caseins representing 60 to 80% of the total protein concentration (Park, 2017). In addition to the nutritional and techno-functional properties of caseins in dairy products, these proteins have the potential to be used in different applications, including the production of peptides with improved biological and techno-functional properties, such as antioxidant, antihypercholesterolemic, and antihypertensive activity (Li et al., 2013; Ibrahim, Ahmed, & Miyata, 2017; Kalyan et al., 2018), and solubility and emulsifying capacity (Luo, Pan, & Zhong, 2014). However, to exert these properties, native protein must be hydrolyzed to release the peptides (Ulug, Jahandideh, & Wu, 2020).

Currently, peptides are mainly obtained by enzymatic hydrolysis, which is a method that has high specificity and does not use organic solvents. However, this process has disadvantages, such as the high cost of enzymes, long hydrolysis time, and low yield. Thus, there is a research field focused on finding alternatives to reduce these limitations (Ulug, Jahandideh, & Wu, 2020).

Recently, new technologies, such as high-pressure processing (HPP) (Leite Júnior et al., 2018; Leite Júnior et al., 2019; Carullo, Barbosa-Cánovas, & Ferrari, 2021), high-pressure homogenization (HPH) (Leite Júnior, Tribst, & Cristianini, 2015; Carullo, Donsì, & Ferrari, 2020), pulsed electric fields (PEF) (Giteru, Oey, & Ali, 2018), high-intensity pulsed light (HILP) (Siddique et al., 2016), microwaves (MW) (Dong, Wang, & Raghavan, 2021) and ultrasound (US) (Soares et al., 2019; Soares et al., 2020), have been studied to enhance enzymatic performance. Strategically, these technologies can be applied alone in enzymes or substrates and, for some processes, through assisted reactions, aiming to improve biocatalysis (Ulug, Jahandideh, & Wu, 2020). However, some of these technologies have limitations for industrial application, such as high cost and scalability limitations.

Among these technologies, the US is considered an economically viable technology, and advances in its efficiency and versatility have expanded its applications in the food industry (Kadam et al., 2015). The effect of US on proteins, including casein, has already been studied (mainly using probe ultrasound), and the results showed that high energy conditions (high power and high temperature) can disrupt hydrophobic interactions and

hydrogen bonds of protein molecules (Zhang et al., 2018; Wu et al., 2018; Koirala, Prathumpai, & Anal, 2021), inducing molecular unfolding or aggregation, as well as protein defragmentation (Wu et al., 2018; Zhang et al., 2018) due to changes in protein secondary and tertiary structures (Wu et al., 2018; Koirala, Prathumpai, & Anal, 2021). These changes may lead to an increase in surface hydrophobicity through exposure of sulfhydryl and hydrophobic groups (Wu et al., 2018), contributing to improvements in the techno-functional properties (Zhang et al., 2018).

However, the effect of bath US-assisted reactions on the production of bioactive and techno-functional peptides from the hydrolysis of casein from goat milk has not yet been explored. Compared with the use of probe US, bath US has advantages such as lower equipment cost, greater resistance for operating in milder conditions, and greater scalability potential (Soares et al., 2019; Soares et al., 2020). Therefore, this work aimed to evaluate the effect of bath ultrasound- assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein (GMC) and the impact on the solubility and antioxidant activity of the hydrolysates obtained.

2. Material and methods

2.1 Enzymes and goat milk casein (GMC)

Three commercial proteases were used in the study: Brauzyn® 100 L (papain) donated from Prozyn Biosolutions (São Paulo, Brazil) and Alcalase® (*Bacillus licheniformis*) and Flavourzyme® (*Bacillus oryzae*) donated from Novozymes Latino Americana Ltda (Paraná, Brazil).

Fresh goat milk was obtained from the goat sector of the Federal University of Viçosa (Viçosa, MG, Brazil). Goat milk was obtained from 80 lactating animals of the Saanen breed. These animals (lot of 12 goats) are kept in pens with wood shaving bedding. The goats have free access to solarium, water, mineral salt, and corn silage (corn, straw, cob). Their diet was supplemented with a mixture of corn grain, soybean meal, salt, lime, urea, and vitamin complex supplied 3 times daily. The average milk composition was 3.5% lactose, 4.8% protein, 4.5% fat, and 13.7% total dry extract.

Casein extraction was carried out by isoelectric precipitation according to the method described by Kalyan et al. (2018) with some modifications. After obtaining, the goat milk was skimmed by centrifugation at 2000 rpm for 20 min at 4 °C. The skim milk was heated to 37 °C, and the pH was adjusted to 4.1 (isoelectric point) under constant stirring using HCl (1 M).

After the isoelectric precipitation of the caseins, centrifugation was carried out at 3500 rpm for 30 min to separate the casein and whey. The obtained pellet (casein) was lyophilized to obtain goat milk casein (GMC) with 1.6% moisture and 88.6% protein and 9.8% nonprotein dry extract from milk, mainly minerals and residues of fat and lactose.

2.2 Evaluation of enzyme activity in GMC at different temperatures

The optimal temperature (ranging from 25 to 65 °C) of each enzyme was determined according to the methodology described by Leite Júnior, Tribst, & Cristianini (2014). An aliquot of 50 mL of GMC protein solution (1% w/v) was dispersed under agitation at 100 rpm in sodium phosphate buffer solution (pH 6.8; 0.1 M) and kept in a thermostatic bath for 10 min to equilibrate the reaction temperature. After this, 0.5 mL of the enzyme solution (Alcalase 1% v/v, Brauzyn 2% w/v, and Flavourzyme 3% v/v – concentrations defined based on Km values and within the dilution range recommended by the manufacturers) diluted in the same buffer was added, and hydrolysis was carried out for 30 min. Then, 1 mL of the hydrolysate was removed and added to 1 mL of trichloroacetic acid (TCA) (20% w/v) to stop the reaction. The solution was centrifuged at 7500g for 15 min at 4 °C, and the supernatant was measured in a UV light spectrophotometer at an absorbance of 280 nm. The UV absorbance at 280 nm is suitable for determining peptides that have phenylalanine (Phe), tyrosine (Tyr) or tryptophan (Trp) in their composition. The use of this technique in this study is justified by the relatively high amount of these amino acids present in goat casein (Park, 2017). A control sample (blank) was prepared by adding TCA at time 0, and the final value was determined from the difference in absorbance between the sample and the blank. An activity unit (U) was arbitrarily defined as the amount of enzyme required to promote a 0.1 increase in absorbance at 280 nm under the assay conditions. Enzyme activity was calculated according to equation 1 (1).

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta Abs_{280nm} \cdot 10 \cdot \text{dilution factor}}{0,5 \cdot 30} \quad (1)$$

The temperature condition with the highest activity was established as optimal, with 100% of the enzymatic activity. The relative enzyme activity (REA) was calculated according to equation 2 (2).

$$REA (\%) = \left(\frac{\text{activity non_optimal condition}}{\text{activity optimal condition}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

2.3 US-assisted enzymatic hydrolysis of GMC

The US-assisted hydrolysis of the GMC was performed in an ultrasonic bath (Unique, model USC 2800 A, Indaiatuba, Brazil) with temperature control, nominal capacity 9.5 L, internal dimensions of 30 × 24 × 15 cm, equipped with five transducers of 25 kHz arranged below the vat and rated power of 450 W.

Enzyme solutions (Alcalase 1% v/v, Brauzyn 2% w/v, and Flavourzyme 3% v/v) and GMC protein solution (1% w/v) were used at an enzyme-substrate ratio of 1%. The US bath was previously filled with a volume of 6.5 L of distilled water, and a glass beaker containing the solution was positioned at the point of maximum exposure to ultrasonic intensity. The process was carried out at pH 6.8 with a volumetric power of 38 W/L (previously determined by the aluminum foil method (Vinatoru, 2015)) at the optimal enzyme temperature (60 °C, for all enzymes) for 300 min. A stainless-steel heat exchanger was coupled to the ultrasonic bath and to an external water bath to control the temperature of the samples. For comparison of the processes, conventional hydrolysis was carried out in a thermostatic bath under the same conditions of pH, time, and temperature of the samples hydrolyzed under US. In addition, GMC without enzyme addition was subjected to US processing under the same conditions of pH, time, and temperature to determine whether US or residual activity of any endogenous/microbial enzyme of GMC could hydrolyze the substrate under the processing conditions. The hydrolysis was measured by the degree of hydrolysis (DH) and the TCA soluble protein concentration.

2.3.1 Degree of hydrolysis

The degree of hydrolysis (DH) was determined by the pH-stat method according to Adler-Nissen (1986). For this, the enzyme solutions and the GMC protein solution were prepared in distilled water, and the initial pH was adjusted to 6.8 and maintained at this value for 300 min of hydrolysis at 60 °C by adding NaOH (0.1 M). The DH is defined as the percent ratio between the number of peptide bonds broken (h) and the total number of peptide bonds in the substrate studied (h_{tot}), calculated according to equation 3 (3):

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100 = \frac{V \cdot C}{\alpha \cdot M \cdot h_{tot}} \cdot 100 \quad (3)$$

where V (mL) is the consumption volume of NaOH, C (mol/L) is the concentration of NaOH, α is the average degree of dissociation of α -NH₂ amino groups released during hydrolysis at a given pH and temperature (0.414 for all enzymes, calculated according to Kurozawa, Park, &

Hubinger (2009)), M (g) is the mass of protein to be hydrolyzed in the reaction mixture, and h_{tot} (mmol/g) is the molar number of peptide bonds per unit mass of protein, which is 8.2 for GMC (Gong et al., 2020).

2.3.2 TCA soluble protein concentration

The TCA soluble protein concentration was determined according to the procedures described by Bucko et al. (2016). For this, after 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, and 300 min of hydrolysis at 60 °C, aliquots were collected and added to TCA (20% w/v) at a 1:1 ratio to stop the reaction. Subsequently, the mixture was centrifuged at 7500g for 15 min at 4 °C. After centrifugation, the total protein content and the TCA-soluble protein fraction were determined by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as a standard. The % of TCA-soluble proteins was calculated by the ratio between the TCA-soluble protein (P_{TCA}) content and the total protein fraction (P_{total}), according to equation 4 (4).

$$TCA \text{ soluble protein concentration (\%)} = \frac{P_{TCA}}{P_{total}} \cdot 100 \quad (4)$$

2.3.3 GMC hydrolysis kinetics

The GMC hydrolysis kinetics were evaluated using a model of first-order kinetics, where the reaction rate was demonstrated by the increase in the degree of hydrolysis (DH) or TCA soluble protein concentration (C), following equation 5 (5).

$$DH_t = DH_{\infty} (1 - e^{-k_1 t}) \text{ or } C_t = C_{\infty} (1 - e^{-k_2 t}) \quad (5)$$

Where:

DH_t = Degree of hydrolysis (%) at time t;

DH_{∞} = Final degree of hydrolysis (%);

C_t = TCA soluble protein concentration (mg/L) at time t;

C_{∞} = Final concentration of TCA soluble protein (mg/L);

t = Time of enzymatic reaction (min);

k = hydrolysis reaction rate (min^{-1}) at a given temperature.

k = k_1 and k_2 , which represent the GMC hydrolysis quantified by DH or TCA soluble protein concentration, respectively.

2.4 Evaluation of solubility and *in vitro* antioxidant activity of hydrolysates obtained from ultrasound-assisted hydrolysis of GMC

To determine the solubility and antioxidant activity of the hydrolysates, the reaction was carried out in a US bath under the same conditions described in item 2.3. After 30, 120, and 300 min of hydrolysis at 60 °C, aliquots were collected, boiled for 10 min to stop the reaction, and centrifuged at 7500g for 15 min at 4 °C to obtain the supernatant. As a control, conventional hydrolysis was carried out in a water bath under the same conditions, and aliquots were also collected at the same time during hydrolysis. In addition, native protein (nonhydrolyzed) was also evaluated.

2.4.1. Solubility

The solubility of native GMC proteins and hydrolysates was determined according to the method of Morr et al. (1985), with modifications. Analyses were carried out at pH values ranging from 2.0 to 10.0 with a 2.0 interval. After pH adjustment, the samples were centrifuged at 7500g for 15 min at 4 °C. The protein content in the supernatant was determined by the method of Lowry et al. (1951). Solubility (%) was calculated according to equation 6 (6).

$$\text{Solubility (\%)} = \left(\frac{\text{Protein content in the supernatant}}{\text{Total protein content in the sample}} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

2.4.2. *In vitro* antioxidant activity

In vitro antioxidant activity was measured by two different assays: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activities. The DPPH radical scavenging activity was determined according to the methodology described by Timon et al. (2019), with some modifications. For this, an aliquot of 700 µL of the sample was added to 700 µL of ethanol (99.5%) and 175 µL of ethanol containing 0.01% DPPH. The mixture was kept at room temperature for 60 min in the dark, and its absorbance was read at 517 nm. The blank was prepared under the same conditions, replacing the sample by sodium phosphate buffer (0.1 M). The DPPH radical scavenging capacity was expressed as a percentage of inhibition and was calculated using equation 7 (7).

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(Abs_{0 \text{ min}} - Abs_{60 \text{ min}})}{Abs_{0 \text{ min}}} \cdot 100 \quad (7)$$

Where: Abs_{0min} is the absorbance of the sample at time 0 and Abs_{60min} is the absorbance of the sample after 60 min of reaction.

The ABTS radical scavenging activity was determined according to the method described by Zhong et al. (2021) with some modifications. The stock solution containing ABTS (7 mM) and potassium persulfate (2.45 mM) (1:1 ratio), was prepared and stored in the dark at 4 °C for 12-16 h before use. The solution was then diluted using distilled water to an absorbance of 0.700 ± 0.02 at 734 nm. Subsequently, 150 μ L of the hydrolysate sample (diluted 1:100) was added to 2.85 mL of the diluted ABTS radical solution. After 60 min of incubation in the dark at room temperature, the absorbance of the mixture was read at 734 nm. The ABTS radical scavenging activity was calculated using equation 7.

2.5 Experimental design and statistical analysis

The experiment was carried out using a completely randomized design (CRD). The processes were performed with three independent repetitions, and analyses were carried out in triplicate for each repetition of processing ($n = 9$). The results are expressed as the mean \pm standard deviation.

The parameters of each mathematical model (DH_{∞} , C_{∞} , k_1 and k_2 parameters in Equation 5) were determined by nonlinear regression using Curve Expert Professional software (version 2.6.5, Hyams Development, Chattanooga, USA) at a significance level of 95%.

The REA, solubility, and *in vitro* antioxidant activity data were analyzed using one-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test for multiple comparisons at 95 % of probability (Statistical Analysis System - SAS Institute, Cary, NC, USA; version 9.2).

3. Results and Discussion

3.1 Enzyme activity in GMC at different temperatures

The effect of temperature on the relative enzymatic activity (REA) of enzymes is shown in Figure 1. The optimum temperature obtained for all enzymes was 60 °C. Thus, this condition was defined for carrying out hydrolysis using different proteases. In addition, this temperature is within the range used for these enzymes in other studies with different substrates (Queiroz et al., 2017; Wang et al., 2021).

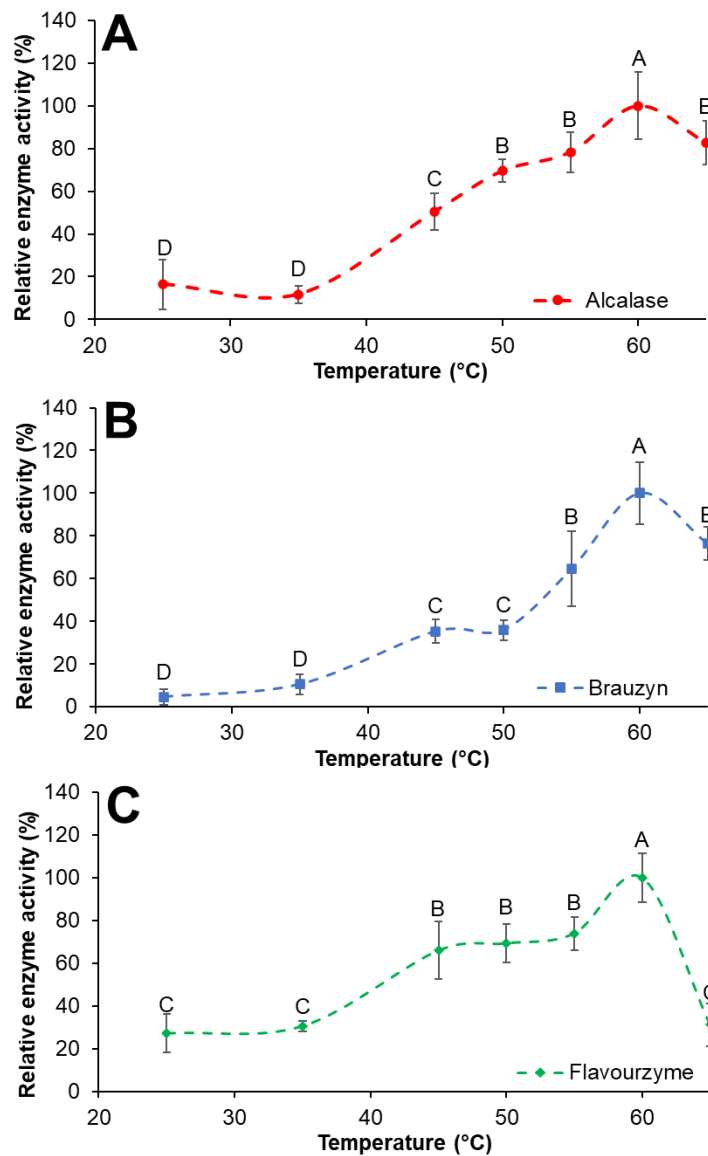


Figure 1. Effect of temperature on the relative enzyme activity (REA) of Alcalase (A), Brauzyn (B), and Flavourzyme (C) on goat milk casein. Vertical bars represent the standard deviation. The temperature condition with the highest activity was established as optimal, with 100% of the enzyme activity. The relative enzyme activity (REA) was calculated using Eq. (1) for all other temperature values.

3.2 US-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein

First, GMC solution without enzyme addition was subjected to US at 60 °C to determine if US or residual activity of any endogenous/microbial enzyme could hydrolyze the substrate under the processing conditions. The results showed no increase in DH or in the concentration of TCA soluble protein for up to 5 h, suggesting that hydrolysis observed in experiments using commercial enzymes could be attributed exclusively to their activity.

From the results, it was observed that ultrasound potentiated enzymatic hydrolysis, promoting an increase in hydrolysis rates (k_1 and k_2) of up to 120% and 50%, respectively ($p < 0.05$). In addition, there was a significant increase in the hydrolysis degree (DH_{∞}) and in the final concentration of TCA-soluble protein (C_{∞}) compared to the conventional hydrolysis, regardless of the enzyme used (Table 1) ($p < 0.05$).

Figure 2 shows the curves of DH and TCA soluble protein concentrations during US-assisted GMC hydrolysis using different enzymes. Table 1 shows the parameters of equation 5 fitted to these curves.

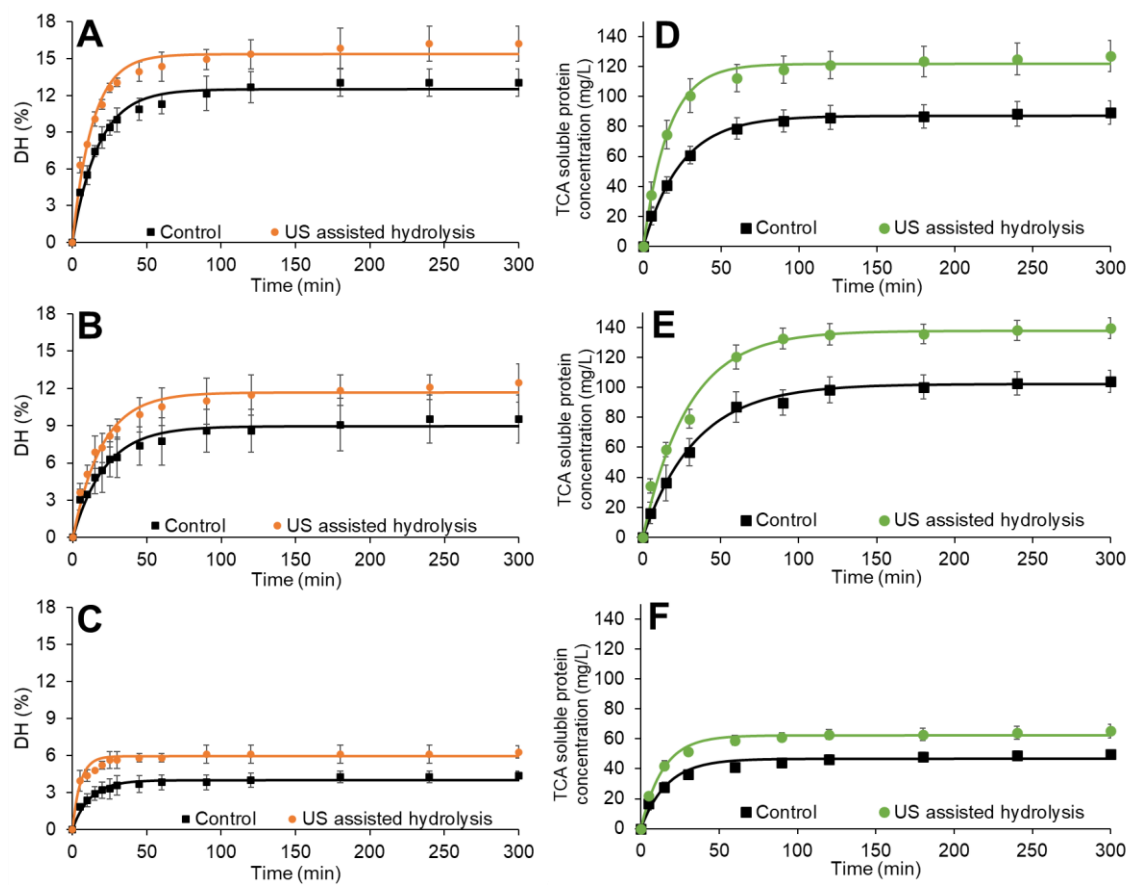


Figure 2. Increase in DH (%) (A, B, and C) and TCA soluble protein concentration (D, E, and F) of goat milk casein hydrolyzed at 60 °C assisted by ultrasound using different enzymes (A and D: Alcalase, B and E: Brauzyne, C and F: Flavourzyme) for 300 min. Dots are experimental data; continuous lines are the predicted data using Eq. (5). *Control means samples submitted to conventional hydrolysis.

Table 1. Parameters of Eq. (5) adjusted to the curve of hydrolysis assisted by ultrasound at 60 °C of goat milk casein using different enzymes by DH (%) and by TCA soluble protein concentration.

| Sample | | #k ₁ (min ⁻¹) | ##DH _∞ (%) | R ² |
|-------------|-----------|--------------------------------------|--------------------------|----------------|
| Alcalase | **Control | *0.057±0.002c | 12.53±1.18b | 0.991 |
| | ***US | 0.073±0.016b | 15.39±1.30a | 0.987 |
| Brauzyn | Control | 0.047±0.006d | 8.97±1.88c | 0.980 |
| | US | 0.051±0.008cd | 11.65±1.31b | 0.985 |
| Flavourzyme | Control | 0.084±0.016b | 4.03±0.54e | 0.969 |
| | US | 0.184±0.086a | 5.96±0.65d | 0.977 |
| Sample | | #k ₂ (min ⁻¹) | ###C _∞ (mg/L) | R ² |
| Alcalase | Control | 0.042±0.005c | 87.3±7.3d | 0.996 |
| | US | 0.063±0.012ab | 121.8±10.3b | 0.994 |
| Brauzyn | Control | 0.029±0.007d | 102.1±6.7c | 0.995 |
| | US | 0.034±0.004cd | 137.9±7.2a | 0.992 |
| Flavourzyme | Control | 0.061±0.012b | 46.6±2.6f | 0.982 |
| | US | 0.072±0.006a | 62.5±3.7e | 0.994 |

*Mean ± standard deviation of nine replicates (n = 9). Different letters in the column quantified by DH or TCA soluble protein concentration indicate significant differences among processes (p<0.05). **Control means samples submitted to conventional hydrolysis, ***US means samples submitted to hydrolysis under US-assisted conditions, #k₁ and k₂ = hydrolysis reaction rate (min⁻¹) at a given temperature quantified by DH or TCA soluble protein concentration, respectively. ##DH_∞ = Final degree of hydrolysis (%); ###C_∞ = Final concentration of TCA soluble protein (mg/L).

The increase in hydrolysis observed can be attributed to three distinctive factors, which are not mutually exclusive: (i) acceleration of mass transfer under ultrasound-assisted reaction (Soares et al., 2019), (ii) occurrence of structural changes on substrate (Koirala, Prathumpai, & Anal, 2021), and/or (iii) on enzymes (Soares et al., 2019; Soares et al., 2020; Li & Tang, 2021).

The mass transfer acceleration can be explained by the high level of energy released during the cavitation phenomenon, which can reduce the diffusion-limiting barrier between the enzyme and the substrate (Wang et al., 2018), increasing the velocity of enzyme activity.

With respect to structural changes in GMC and enzymes, US has been previously described as capable of altering the secondary (α -helix, β -sheet, β -turn and random coil) and tertiary structures of proteins through the disruption of hydrogen bonds and hydrophobic interactions, inducing molecular unfolding and/or protein defragmentation (Wu et al., 2018; Koirala, Prathumpai, & Anal, 2021). These changes can expose sulfhydryl and hydrophobic groups on the substrate (Lei et al., 2011; Wu et al., 2018; Zhang et al., 2018), facilitating the access of the enzyme to the regions of the polypeptide chain susceptible to hydrolysis, consequently improving the kinetic parameters of proteolysis under US. In enzymes, structural changes and unfolding may expose active sites entrapped in the catalytic core of native enzymes (Li & Tang, 2021), improving their performance.

Although the three proteases studied are recommended to produce hydrolysates, they have several specificities, justifying the comparative study between them. Brauzyn (papain) is a plant-derived protease with exogenous activity that cleaves peptide bonds from hydrophobic regions, including amino acids Ala, Val, Leu, Phe, Trp, and Tyr, while Flavourzyme preferentially cleaves the peptide bond between Leu and Pro or Pro and Pro. Alcalase is an endoprotease of microbial origin that hydrolyses peptide bonds containing hydrophobic residues with carboxyl groups Phe, Tyr, Trp and Lys and has already been identified with great efficiency in the production of functional peptides from proteins (Queiroz et al., 2017; Wang et al., 2021).

Comparing the results of different enzymes, Alcalase had the highest DH_{∞} (15.39%), which explains why this enzyme was chosen for protein hydrolysis aiming to produce peptides in several studies (Liang et al., 2017; Wali et al., 2017; Wu et al., 2018). However, with respect to the use of US to potentialize DH_{∞} , better results were observed for Flavourzyme, followed by Brauzyn and Alcalase (48%, 30%, and 23%, respectively) ($p < 0.05$).

A higher DH indicates a greater number of cleaved peptide bonds (Wang et al., 2016) and, consequently, of hydrolysates with potential improvement of their techno-functional, such as solubility. Protein solubility is an essential property for hydrolysates because it directly impacts the performance of other properties (Omura et al., 2021).

Regarding the impact of US-assisted hydrolysis on the final TCA soluble protein concentration, Alcalase also stood out (US-assisted hydrolysis resulted in a 40% increase in the final TCA soluble protein concentration), as well as Brauzyn, which showed an increase of 35% and the highest final concentration (137.9 ± 7.2 mg/L) (Table 1) ($p < 0.05$). Notably,

TCA soluble proteins have low molecular weight and consequently have greater potential to perform biological activities (Karami et al., 2019).

3.3 Evaluation of protein solubility during ultrasound-assisted hydrolysis

Solubility is a prerequisite for peptides to properly perform their biological and techno-functional properties, ensuring wide application in the food and pharmaceutical industries. Figure 3 shows the solubility at different pH values (2 to 10) of GMC hydrolyzed using conventional and US-assisted processes for 30, 120, and 300 min.

For native goat milk casein, the highest percentage of soluble proteins was obtained at extreme pH values (69.4% at pH 2.0 and up to 74.0% at pH 10.0) and lower solubility at pH values closer to the isoelectric point of the GMC (pH 4.1 - Recio et al., 1997) (5.2% at pH 4.0 and 24% at pH 6.0). These results were expected considering the low solubility of the casein fractions (close to the isoelectric point of α_{s1} (4.96) and β -casein (5.19)) in milk (Cayot, Courthaudon, & Lorient, 1991; Duarte et al., 1998). It is important to note that, in milk, casein remains suspended at pH 6.8 due to colloidal dispersion involving micellar structures and minerals (Walstra, Wouters, & Geurts, 2006).

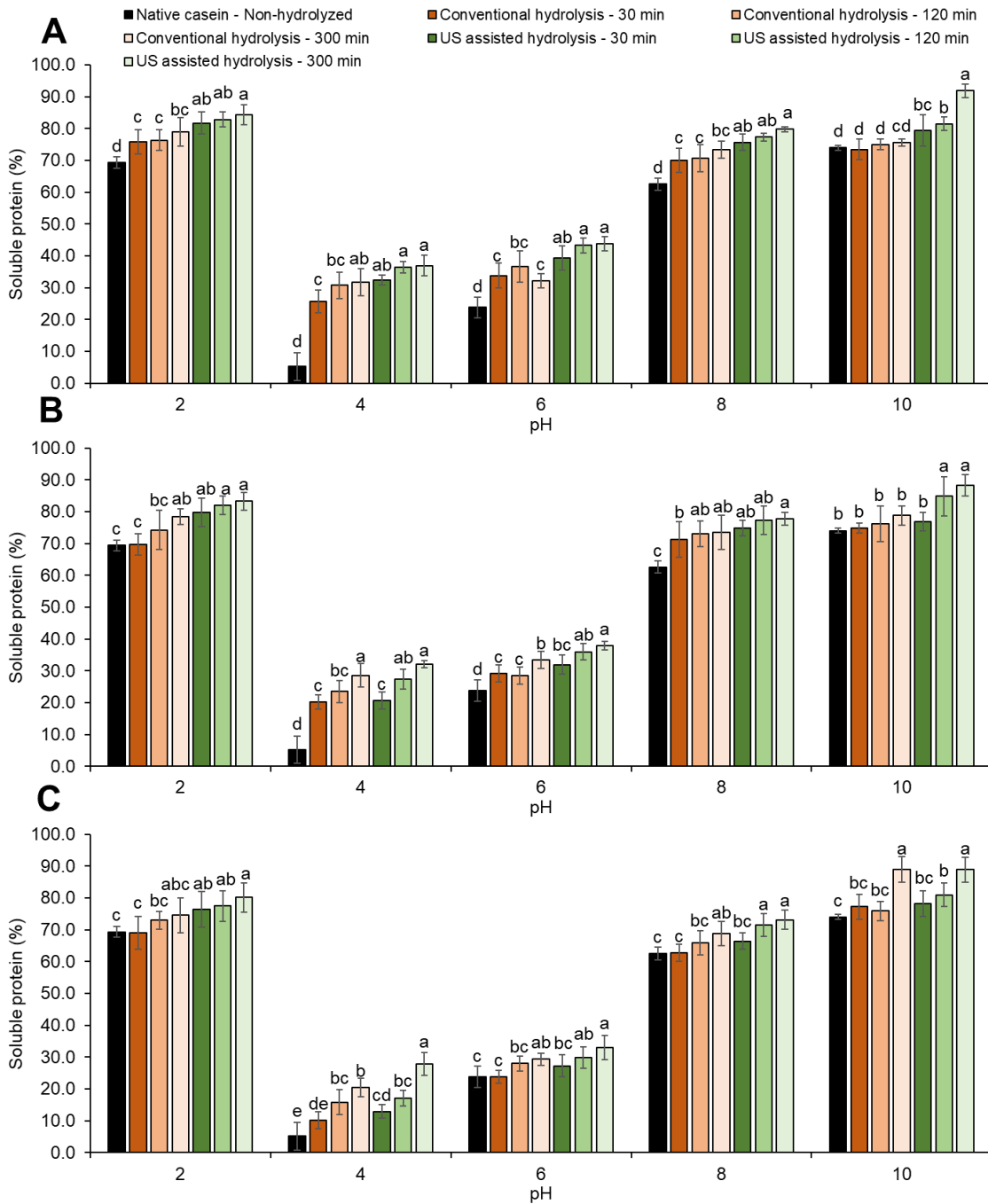


Figure 3. Protein solubility (%) of goat milk casein from conventional and ultrasound-assisted hydrolysis at 60 °C using different enzymes (A: Alcalase, B: Brauzyne, C: Flavourzyme) for up to 300 min. Different letters at each pH indicate significant differences among samples ($p < 0.05$).

Despite the higher solubility at pH 2 and 10, working under these conditions requires attention and further studies on the possible associated implications. The products generated at these extreme pH values may show a greater degree of conformational changes with

unknown impacts on functionality caused by the ionization of some amino acids and terminal amino and carboxylic groups.

Enzymatic hydrolysis improved the solubility of unprocessed GMC, especially at pH 4 (from 5.2% to 31.7%) ($p < 0.05$). Other studies also found similar results (Luo, Pan, & Zhong, 2014; Al-Shamsi et al., 2018), which are explained by the reduced molecular weight of the hydrolysates, their higher solvation and because they may have a higher proportion of hydrophilic peptide units (Kilara & Panyam, 2003).

Compared to conventional hydrolysis, US-assisted hydrolysis enhanced solubility under most evaluated conditions, with an increase of up to 35.7% ($p < 0.05$). The effect of the technology was considered satisfactory, since, in all evaluated conditions, no lower solubility was observed in the samples hydrolyzed under US compared to the respective conventional hydrolysis. The best impact of US was observed for Alcalase, independent of pH, since the solubility of the sample hydrolyzed under US for 30 min was higher or similar to the sample hydrolyzed for 300 min using conventional hydrolysis.

Therefore, US can be applied to optimize the GMC hydrolysis process, reducing the reaction time by up to 10x, or to achieve higher solubility levels through hydrolysis in longer processes, which ensures higher productivity and yield. These results corroborate those obtained in section 3.2, which showed an increase in the final concentration of TCA-soluble protein (up to 40%) for US-assisted hydrolysis compared to conventional hydrolysis.

3.4 *In vitro* antioxidant activity of GMC during ultrasound-assisted hydrolysis

Figure 4 shows the *in vitro* antioxidant activities of GMC and its hydrolysates obtained by conventional and US-assisted hydrolysis at 60 °C using different enzymes for up to 300 min. The results showed that conventional hydrolysis (30 min for Alcalase and Brauzyn and 300 min for Flavourzyme) increased the samples' ability to scavenge DPPH and ABTS radicals by up to 2.7 times ($p < 0.05$) compared to unprocessed GMC. Similar results were obtained by Li et al. (2013), who observed higher free radicals scavenging (DPPH and ABTS assays) after GMC hydrolysis.

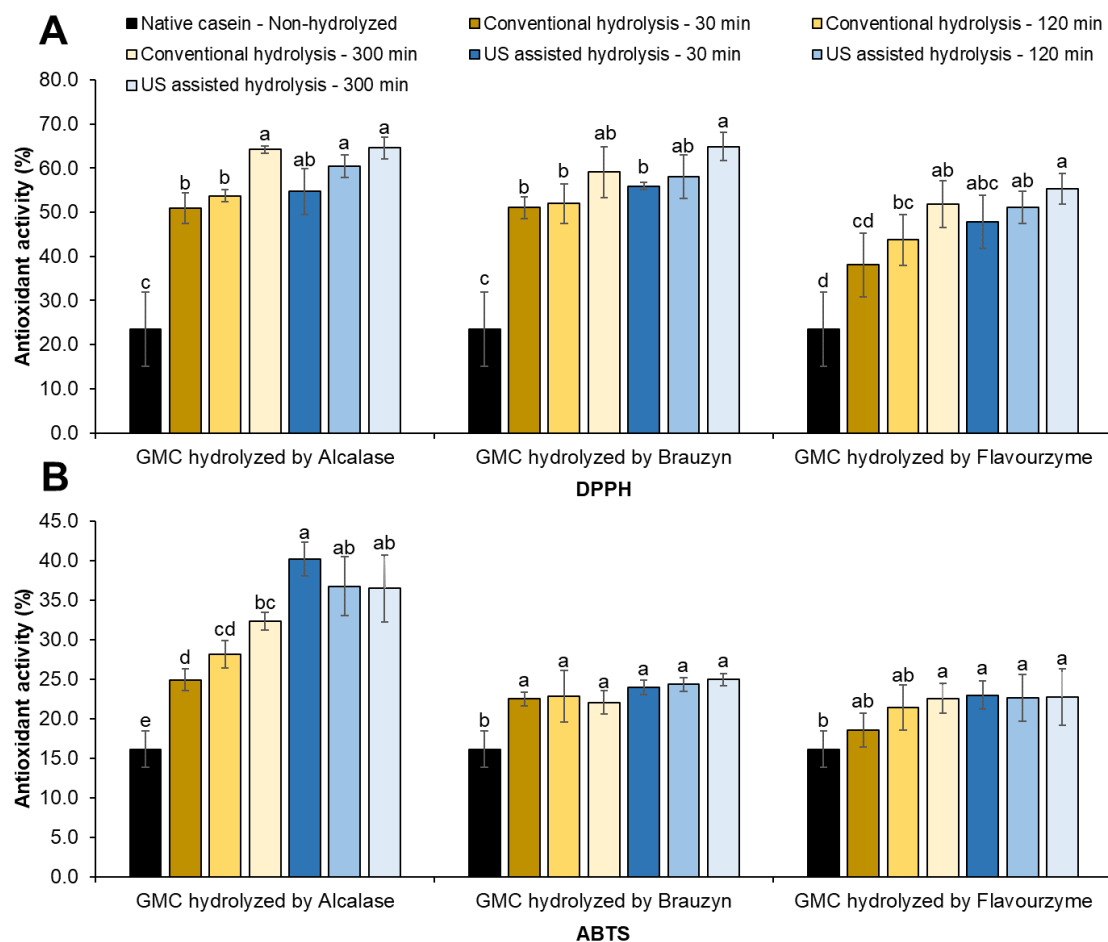


Figure 4. In vitro antioxidant activity from the DPPH (A) and ABTS (B) assays of goat milk casein during conventional and ultrasound-assisted hydrolysis at 60 °C using different enzymes for up to 300 min. Different letters for each enzyme indicate significant differences among processes ($p < 0.05$).

Oligopeptides from goat milk casein hydrolysis commonly have tyrosine and proline in their composition, which are amino acids with antioxidant activity in short polypeptide chains (Li et al., 2013). Peptides with a high content of hydrophobic amino acids have antioxidant activity due to the ability of phenolic groups to be hydrogen donors, which inhibits the radical-mediated peroxidation chain reaction (Ren et al., 2008; Sarmadi & Ismail, 2010; Zhang et al., 2012). In addition, residues (especially Pro, Val, Phe, and His) at the N- and C-terminals positions play a key role in the antioxidant activity due to their higher interaction with fatty acids and improved capturing ability for lipid free radicals (Li et al., 2013).

Thus, comparing the performance of the three different enzymes studied, Flavourzyme possibly had the worst results due to its preference for cleavage of only the peptide bond

between Leu and Pro or Pro and Pro, not favoring the formation of small peptides with other hydrophobic amino acids, such as Try, Tyr and Phe. On the other hand, the higher antioxidant capacity of the hydrolysates obtained with Brauzyn and Alcalase might be explained by the ability of these enzymes to also cleave bonds with these other hydrophobic residues present in GMC (Queiroz et al., 2017; Wang et al., 2021).

Regarding the effect of the US-assisted reaction, only for hydrolysates obtained using Alcalase, a higher scavenging capacity ($p < 0.05$) of ABTS and DPPH was observed after 30 (up to 61% increase) and 120 min (up to 12% increase) of hydrolysis, respectively. Furthermore, especially for the ABTS radical, it was found that US-assisted Alcalase hydrolysis accelerated the production of peptides with *in vitro* antioxidant activity 10-fold ($p < 0.05$). Similarly, other studies showed that hydrolysates obtained by the action of Alcalase from vegetal proteins preprocessed by US showed an increase in the scavenging capacity of DPPH and ABTS radicals (Liang et al., 2017; Guerra-Almonacid et al., 2019).

These results are consistent with those on the effect of US on the final concentration of TCA soluble protein, in which Alcalase had the best result (40% increase). This may justify the impact on antioxidant activity, since peptides with biological properties usually have low molecular weight, such as TCA-soluble protein. In addition, the application of different proteases can produce hydrolysates with different antioxidant capacities due to the specificity of the enzyme by the substrate and its mechanisms of action (endo and exo-peptides) (Castro & Sato, 2015).

Antioxidant compounds inhibit the oxidation process, which is a biochemical reaction capable of producing free radicals that can damage cells. (Koirala, Prathumpai, & Anal, 2021). Therefore, the results found in this study are promising and encourage further investigations aimed at obtaining and using GMC hydrolysates and their purified fractions as antioxidant ingredients in the food industry.

This is an exploratory study that evaluates the possibility of hydrolyzing GMC by commercial proteases in a US-assisted reaction, aiming to produce peptides with potential techno-functional properties and biological activities. As commonly occurs in exploratory process research, the need to work with many variables (i.e., number of enzymes, process type and processing time) results in dozens of samples, limiting the capacity of the research to deeply explore them. Thus, this study has some limitations: (i) the peptides obtained were not identified, (ii) solubility was the only techno-functional property evaluated by Lowry's method, (iii) bioactivity was only evaluated by antioxidant properties, and no *in vivo* tests

were performed, and (iv) the allergenic power and toxicological effects of the produced compounds were not evaluated.

Although data obtained for solubility and antioxidant capacity under experimental conditions are considered good indicators of protein functionality (Li et al., 2013; Liang et al., 2021), *in vitro* data are not conclusive about *in vivo* outcomes (Agostini-Costa, 2020). To claim functionality, it is necessary to carry out other works focusing on food production to determine the techno-functional properties, as well as clinical trials to prove the biological properties (Agostini-Costa, 2020). In addition to evaluating the possible functionalities, it is necessary to study the potential side effects, especially for unpurified peptides (Dullius et al., 2020).

Furthermore, in future work, the peptides obtained under optimized conditions should be identified, and their allergenic power (Elias, Kellerby, & Decker, 2008) and toxicological effects (Elias, Kellerby, & Decker, 2008; Oliveira, Fuentes-Silva, & King, 2012) must be measured before their commercial application as food or pharmacological ingredients.

4. Conclusions

The US-assisted enzymatic hydrolysis of GMC was evaluated for the first time under different conditions for up to 300 min. US increased the hydrolysis rate by up to 120% and the maximum DH (23 - 48%) and concentration of TCA-soluble protein (up to 40%). Consequently, for most evaluated conditions, US-assisted GMC hydrolysis improved the solubility of the hydrolyzed product (up to 35.7%) and potentiated the *in vitro* antioxidant activity of hydrolysates. The overall evaluation of the results highlighted that, among the studied enzymes, Alcalase is the best for producing GMC hydrolysates, either with conventional or US-assisted hydrolysis, and that these compounds have potentially interesting techno-functional and biological activities. Further studies are needed to deeply explore the techno-functional and biological activities of the hydrolysates produced under optimized conditions, to assess the risks regarding peptides allergenicity and toxicity, and to use these hydrolysates as food ingredients or even as dietary supplements with claims of therapeutic properties.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001; the Minas Gerais Research Foundation

(FAPEMIG, Brazil) for funding the project APQ-00388-21 and the National Council for Scientific and Technological Development for funding project 429033/2018-4 and the productivity grants of B.R.C. Leite Júnior (306514/2020-6) and A.A.L. Tribst (305050/2020-6).

5. References

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London, UK: Elsevier Applied Science Publishers.
- Agostini-Costa, T. S. (2020). Bioactive compounds and health benefits of Pereskioideae and Cactoideae: A review. *Food Chemistry*, 327, Article e126961. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126961>
- Al-Shamsi, K. A., Mudgil, P., Hassan, H. M., & Maqsood, S. (2018). Camel milk protein hydrolysates with improved technofunctional properties and enhanced antioxidant potential in vitro and in food model systems. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 47-60. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13194>
- Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Petrović, L., & Milinković, J. (2016). Influence of enzymatic hydrolysis on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 60, 271-278. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.005>
- Carullo, D., Barbosa-Cánovas, G. V., & Ferrari, G. (2021). Changes of structural and technofunctional properties of high hydrostatic pressure (HHP) treated whey protein isolate over refrigerated storage. *LWT*, 137, Article e110436. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110436>
- Carullo, D., Donsì, F., & Ferrari, G. (2020). Influence of high-pressure homogenization on structural properties and enzymatic hydrolysis of milk proteins. *LWT*, 130, Article e109657. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109657>
- Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 55-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.07.001>
- Cayot, P., Courthaudon, J. L., & Lorient, D. (1991). Emulsifying properties of pure and mixed. α 1- and β -casein fractions: effects of chemical glycosylation. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry, 39(8), 1369-1373.
<https://doi.org/10.1021/jf00008a003>

- Dong, X., Wang, J., & Raghavan, V. (2021). Impact of microwave processing on the secondary structure, in-vitro protein digestibility and allergenicity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) proteins. *Food Chemistry*, 337, Article e127811. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127811>
- Duarte, Â. J., Carreira, R. L., Junqueira, R. G., Coelho, J. V., & Silvestre, M. P. C. (1998). Emulsifying properties and solubility of casein and its tryptic hydrolysates: 1. Effects of pH and hydrolysis time. *Food Science and Technology*, 18, 295-302. <https://doi.org/10.1590/S0101-20611998000300008>
- Dullius, A., Fassina, P., Girolodi, M., Goettert, M. I., & de Souza, C. F. V. (2020). A biotechnological approach for the production of branched chain amino acid containing bioactive peptides to improve human health: A review. *Food Research International*, 131, Article e109002. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109002>
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430-441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>
- Giteru, S. G., Oey, I., & Ali, M. A. (2018). Feasibility of using pulsed electric fields to modify biomacromolecules: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 91-113. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.009>
- Gong, H., Gao, J., Wang, Y., Luo, Q. W., Guo, K. R., Ren, F. Z., & Mao, X. Y. (2020). Identification of novel peptides from goat milk casein that ameliorate high-glucose-induced insulin resistance in HepG2 cells. *Journal of Dairy Science*, 103(6), 4907-4918. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17513>
- Guerra-Almonacid, C. M., Torruco-Uco, J. G., Murillo-Arango, W., Méndez-Arteaga, J. J., & Rodríguez-Miranda, J. (2019). Effect of ultrasound pretreatment on the antioxidant capacity and antihypertensive activity of bioactive peptides obtained from the protein hydrolysates of *Erythrina edulis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31, 288-296. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2019.v31.i4.1938>
- Ibrahim, H. R., Ahmed, A. S., & Miyata, T. (2017). Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *Journal of Advanced Research*, 8(1), 63-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2016.12.002>
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C., & O'Donnell, C. P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides.

Trends in Food Science & Technology, 46(1), 60-67.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.012>

- Kalyan, S., Meena, S., Kapila, S., Sowmya, K., & Kumar, R. (2018). Evaluation of goat milk fat and goat milk casein fraction for anti-hypercholesterolaemic and antioxidative properties in hypercholesterolaemic rats. *International Dairy Journal*, 84, 23-27.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.03.012>
- Karami, Z., Peighambaroust, S. H., Hesari, J., Akbari-Adergani, B., & Andreu, D. (2019). Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates. *Food Bioscience*, 32, Article e100450.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100450>
- Kilara, A., & Panyam, D. (2003). Peptides from milk proteins and their properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(6), 607-633.
<https://doi.org/10.1080/10408690390251138>
- Koirala, S., Prathumpai, W., & Anal, A. K. (2021). Effect of ultrasonication pretreatment followed by enzymatic hydrolysis of caprine milk proteins and on antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of peptides thus produced. *International Dairy Journal*, 118, Article e105026.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105026>
- Kurozawa, L. E., Park, K. J., & Hubinger, M. D. (2009). Influence of process conditions on enzymatic hydrolysis kinetics of chicken meat. *Food Science and Technology*, 29, 557-566. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000300017>
- Lei, B., Majumder, K., Shen, S., & Wu, J. (2011). Effect of sonication on thermolysin hydrolysis of ovotransferrin. *Food Chemistry*, 124(3), 808-815.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.100>
- Leite Júnior, B. R. C., Tribst, A. A. L., & Cristianini, M. (2014). Proteolytic and milk-clotting activities of calf rennet processed by high pressure homogenization and the influence on the rheological behavior of the milk coagulation process. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 21, 44-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.11.006>
- Leite Júnior, B.R.C., Tribst, A.A.L., & Cristianini, M. (2015). Influence of high pressure homogenization on commercial protease from *Rhizomucor miehei*: Effects on proteolytic and milk-clotting activities. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 739-744. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.020>
- Leite Júnior, B.R.C., Tribst, A.A.L., Yada, R. Y., & Cristianini, M. (2018). Milk-clotting activity of high pressure processed coagulants: Evaluation at different pH and

- temperatures and pH influence on the stability. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 47, 384-389. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.04.006>
- Leite Júnior, B.R.C., Tribst, A.A.L., Ribeiro, L. R., & Cristianini, M. (2019). High pressure processing impacts on the hydrolytic profile of milk coagulants. *Food Bioscience*, 31, Article e100449. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100449>
- Li, Z., Jiang, A., Yue, T., Wang, J., Wang, Y., & Su, J. (2013). Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4242-4251. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6511>
- Li, F., & Tang, Y. (2021). The activation mechanism of peroxidase by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 71, Article e105362. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105362>
- Liang, Q., Ren, X., Ma, H., Li, S., Xu, K., & Oladejo, A. O. (2017). Effect of low-frequency ultrasonic-assisted enzymolysis on the physicochemical and antioxidant properties of corn protein hydrolysates. *Journal of Food Quality*, 2017, Article e2784146. <https://doi.org/10.1155/2017/2784146>
- Liang, Q., Sun, X., Raza, H., Khan, M. A., Ma, H., & Ren, X. (2021). Fabrication and characterization of quercetin loaded casein phosphopeptides-chitosan composite nanoparticles by ultrasound treatment: Factor optimization, formation mechanism, physicochemical stability and antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 80, Article e105830. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105830>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Luo, Y., Pan, K., & Zhong, Q. (2014). Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: partial characterizations. *Food chemistry*, 155, 146-154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.048>
- Morr, C. V., German, B., Kinsella, J. E., Regenstein, J. M., Buren, J. V., Kilara, A., ... & Mangino, M. E. (1985). A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, 50(6), 1715-1718. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb10572.x>
- Oliveira, J. S., Fuentes-Silva, D., & King, G. F. (2012). Development of a rational nomenclature for naming peptide and protein toxins from sea anemones. *Toxicon*, 60(4), 539-550. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.020>
- Omura, M. H., de Oliveira, A. P. H., de Souza Soares, L., dos Reis Coimbra, J. S., de Barros, F. A. R., Vidigal, M. C. T. R., ... & de Oliveira, E. B. (2021). Effects of protein

- concentration during ultrasonic processing on physicochemical properties and techno-functionality of plant food proteins. *Food Hydrocolloids*, 113, Article e106457. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106457>
- Park, Y. W. (2017). Goat milk—chemistry and nutrition. In Y. W. Park, G. F. W. Haenlein, & W. L. Wendorff (Eds.), *Handbook of milk of non-bovine mammals*, (pp.42-83). John Wiley & Sons, Inc.
- Pulina, G., Milán, M. J., Lavín, M. P., Theodoridis, A., Morin, E., Capote, J., ... & Caja, G. (2018). Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6715-6729. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14015>
- Queiroz, A. L. M., Bezerra, T. K. A., de Freitas Pereira, S., da Silva, M. E. C., de Almeida Gadelha, C. A., Gadelha, T. S., ... & Madruga, M. S. (2017). Functional protein hydrolysate from goat by-products: Optimization and characterization studies. *Food Bioscience*, 20, 19-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2017.07.009>
- Recio, I., Amigo, L., Ramos, M., & Lopez-Fandiño, R. (1997). Application of capillary electrophoresis to the study of proteolysis of caseins. *Journal of Dairy Research*, 64(2), 221-230. <https://doi.org/10.1017/S0022029996002087>
- Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., ... & Xue, S. J. (2008). Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 108(2), 727-736. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.010>
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- Siddique, M. A. B., Maresca, P., Pataro, G., & Ferrari, G. (2016). Effect of pulsed light treatment on structural and functional properties of whey protein isolate. *Food Research International*, 87, 189-196. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.017>
- Silva, H. W., & Favarin, S. (2020). A importância econômica da criação de cabra leiteira para o desenvolvimento rural. *Revista Científica Rural*, 22(1), 46-53. <https://doi.org/10.30945/rcr-v22i1.3090>
- Soares, A. S., Augusto, P. E. D., Leite Júnior, B. R. C., Nogueira, C. A., Vieira, É. N. R., de Barros, F. A. R., ... & Ramos, A. M. (2019). Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase: Investigation on substrate, enzyme and kinetics parameters. *LWT*, 107, 164-170. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.083>

- Soares, A. S., Leite Júnior, B. R. C., Tribst, A. A. L., Augusto, P. E. D., & Ramos, A. M. (2020). Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate and assisted reaction. *LWT*, *130*, Article e109636. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109636>
- Timón, M. L., Andrés, A. I., Otte, J., & Petrón, M. J. (2019). Antioxidant peptides (< 3 kDa) identified on hard cow milk cheese with rennet from different origin. *Food Research International*, *120*, 643-649. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.019>
- Ulug, S. K., Jahandideh, F., & Wu, J. (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, *108*, 27-39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.002>
- Vinatoru, M. (2015). Ultrasonically assisted extraction (UAE) of natural products some guidelines for good practice and reporting. *Ultrasonics Sonochemistry*, *25*, 94-95. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.003>
- Wali, A., Ma, H., Shahnawaz, M., Hayat, K., Xiaong, J., & Jing, L. (2017). Impact of power ultrasound on antihypertensive activity, functional properties, and thermal stability of rapeseed protein hydrolysates. *Journal of Chemistry*, *2017*, Article e4373859. <https://doi.org/10.1155/2017/4373859>
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology* (2nd ed.). Boca Raton, London, New York: CRC Taylor & Francis Group, 782p.
- Wang, B., Meng, T., Ma, H., Zhang, Y., Li, Y., Jin, J., & Ye, X. (2016). Mechanism study of dual-frequency ultrasound assisted enzymolysis on rapeseed protein by immobilized Alcalase. *Ultrasonics Sonochemistry*, *32*, 307-313. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.03.023>
- Wang, D., Yan, L., Ma, X., Wang, W., Zou, M., Zhong, J., ... & Liu, D. (2018). Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, *119*, 453-461. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.133>
- Wang, Y. Y., Wang, C. Y., Wang, S. T., Li, Y. Q., Mo, H. Z., & He, J. X. (2021). Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases. *Food Chemistry*, *345*, Article e128765. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128765>
- Wu, Q., Zhang, X., Jia, J., Kuang, C., & Yang, H. (2018). Effect of ultrasonic pretreatment on whey protein hydrolysis by alcalase: Thermodynamic parameters, physicochemical

properties and bioactivities. *Process Biochemistry*, 67, 46-54.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.02.007>

Zhang, Y., Duan, X., & Zhuang, Y. (2012). Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides*, 38(1), 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.014>

Zhang, R., Pang, X., Lu, J., Liu, L., Zhang, S., & Lv, J. (2018). Effect of high intensity ultrasound pretreatment on functional and structural properties of micellar casein concentrates. *Ultrasonics Sonochemistry*, 47, 10-16.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.04.011>

Zhong, W., Li, J., Dai, J., Wang, C., & Zhang, T. (2021). Digestibility of polymerized whey protein using in vitro digestion model and antioxidative property of its hydrolysate. *Food Bioscience*, 42, Article e101109. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101109>

CONCLUSÕES GERAIS

O leite de cabra é um alimento que possui grande potencial na produção de peptídeos bioativos e técnico-funcionais, devido ao teor de proteínas com alto valor biológico e ao crescimento do setor caprino nos últimos anos. Embora a hidrólise enzimática seja o método principal de obtenção de peptídeos, suas limitações impulsionam o uso de tecnologias, como o ultrassom, visando melhorar o desempenho enzimático.

Neste trabalho, verificou-se que o US aumentou a taxa de hidrólise, além de provocar um aumento no grau de hidrólise e na concentração final de peptídeos solúveis em TCA. Os resultados possivelmente estão associados à aceleração da transferência de massa durante a reação assistida por ultrassom, além de possíveis alterações físico-químicas e estruturais na CLC, resultando no desdobramento da estrutura complexa da proteína em uma matriz mais simples, o que favorece a cinética de hidrólise por meio da aceleração da reação.

Além disso, a solubilidade dos hidrolisados foi superior à da CLC e aumentou após a hidrólise assistida por US na maioria das condições avaliadas. A tecnologia também potencializou a atividade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados, com redução de até 10 vezes no tempo de hidrólise, especificamente pela ação da Alcalase, no ensaio conduzido com o radical ABTS. Sendo assim, a hidrólise assistida por US da CLC pode ser uma estratégia promissora na geração de peptídeos bioativos e técnico-funcionais, otimizando o processo e favorecendo a agregação de valor ao produto, o que torna o leite caprino mais atraente do ponto de vista econômico.